

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**



**BIOACCESIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE NARANJA  
DULCE (*Citrus sinensis*) Y SU EFECTO SOBRE LA ACUMULACIÓN  
LIPÍDICA EN CÉLULAS 3T3-L1**

**Por:**

**GLORIA ITZEL PEÑA VÁZQUEZ**

**Como requisito parcial para obtener el grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

**MONTERREY, NUEVO LEÓN**

**OCTUBRE, 2019**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**



**BIOACCESIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE NARANJA  
DULCE (*Citrus sinensis*) Y SU EFECTO SOBRE LA ACUMULACIÓN  
LIPÍDICA EN CÉLULAS 3T3-L1**

**Presenta:**

**GLORIA ITZEL PEÑA VÁZQUEZ**

**MONTERREY, NUEVO LEÓN**

**OCTUBRE, 2019**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**



**BIOACCESIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE NARANJA  
DULCE (*Citrus sinensis*) Y SU EFECTO SOBRE LA ACUMULACIÓN  
LIPÍDICA EN CÉLULAS 3T3-L1**

**PRESENTA**

**GLORIA ITZEL PEÑA VÁZQUEZ**

**DIRECTORA**

**DRA. ANA LAURA ISABEL DE LA GARZA HERNÁNDEZ**

**CO-DIRECTOR**

**DR. MARCELO HERNÁNDEZ SALAZAR**

**MONTERREY, NUEVO LEÓN**

**OCTUBRE, 2019**

**APROBACIÓN DE TESIS DE MAESTRÍA**

**BIOACCESIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE NARANJA  
DULCE (*Citrus sinensis*) Y SU EFECTO SOBRE LA ACUMULACIÓN  
LIPÍDICA EN CÉLULAS 3T3-L1**

---

**Dra. Ana Laura Isabel de la Garza Hernández**

Presidente

---

**Dra. Vania Urías Orona**

Secretario

---

**Dr. Marcelo Hernández Salazar**

Vocal

---

**Dra. Blanca Edelia González Martínez**

Subdirección de Investigación, Innovación y Posgrado

## **COMITÉ DE EVALUACIÓN DE TESIS**

El comité de evaluación de tesis **APROBÓ** la tesis titulada “**BIOACCESIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE NARANJA DULCE (*Citrus sinensis*) Y SU EFECTO SOBRE LA ACUMULACIÓN LIPÍDICA EN CÉLULAS 3T3-L1**” presentada por la L.N. Gloria Itzel Peña Vázquez, con la finalidad de obtener el grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

---

**Dra. Vania Urías Orona**

Presidente

---

**Dra. Ana Laura Isabel de la Garza Hernández**

Secretario

---

**Dr. Marcelo Hernández Salazar**

Vocal

**DRA. BLANCA EDELIA GONZÁLEZ MARTÍNEZ**  
**SUBDIRECTORA DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y POSGRADO**  
**FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN, UANL**  
**P R E S E N T E :**

Nos permitimos comunicarle que hemos concluido la Dirección y Codirección de la tesis titulada: **“BIOACCESIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE NARANJA DULCE (*Citrus sinensis*) Y SU EFECTO SOBRE LA ACUMULACIÓN LIPÍDICA EN CÉLULAS 3T3-L1”**, presentada por la L.N. Gloria Itzel Peña Vázquez, con la finalidad de obtener el grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Sin otro asunto en particular, le envío un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

“Alere Flammam Veritatis”

Monterrey, Nuevo León a 11 de octubre de 2019

---

Dra. Ana Laura Isabel de la Garza  
Hernández  
Directora

---

Dr. Marcelo Hernández Salazar  
Co-dirección

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar el profundo cariño y agradecimiento a todas las personas que han intervenido en este trabajo, brindándome apoyo, conocimientos y su tiempo.

Gracias a la Universidad Autónoma de Nuevo León y la Facultad de Salud Pública y Nutrición, por darme la oportunidad de seguir creciendo académica y profesionalmente. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por concederme una beca para la realización de este trabajo a nivel nacional e internacional.

A la Dra. Ana Laura Isabel de la Garza Hernández, por siempre confiar en lo que hago. Gracias por tu dedicación y amor a la ciencia, por alentarme a cumplir nuevos retos. Al Dr. Marcelo Hernández Salazar y la Dra. Vania Urías Orona, por el apoyo brindado en las distintas etapas de este trabajo.

Gracias a la Universidad de Navarra por abrirme las puertas y permitirme realizar mi estancia de investigación en las instalaciones del CIFA. A la Dra. M<sup>a</sup> Paz de Peña Fariza, Dra. M<sup>a</sup> Concepción Cid Canda, Dra. Diana Ansorena Artieda y Elsy, por apoyarme durante mi estancia y hacerme sentir siempre bienvenida. Gracias a las chicas del laboratorio, Esti, Maite y Gwen, por siempre tener una gran paciencia, por su disponibilidad y apoyo.

Al CIDICS, por darme la oportunidad de conocer a personas de la Unidad de Genómica, la Q.C.P Patricia Villarreal Quiroga, a Bianka y Carlos, por toda su paciencia, conocimientos, el apoyo y las risas compartidas. A Liz, en la Unidad de Nutrición, por su gran interés y apoyo en este trabajo, por convertirse en una buena amiga y alguien de quien estoy muy orgullosa.

A mi compañero de aventuras y mi mejor amigo, Rafael, a quien le entrego mi corazón todos los días. Por su paciencia y amor durante estos años, por enseñarme un camino lleno de luz. Te amo por siempre.

Gracias a mi hermano David, por ser parte importante de mi vida, por llenar la casa de alegría siempre. Por la complicidad de enviarnos cosas chistosas para tener un día más agradable y que, en ocasiones, era lo que necesitaba para seguir adelante.

Por último, quiero agradecer a las personas que han estado presentes en cada paso que he dado, mis padres. Por acompañarme hasta el otro lado del mundo. Gracias por siempre estar conmigo, incluso cuando yo no estuve presente. Ustedes siempre serán mi más grande amor.

**Gracias**



*A mis personas especiales que están siempre presentes,  
recordándome que todo puede ser posible con  
dedicación, tiempo y pasión.*

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
<b>RESUMEN</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	11
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	12
2.1 Obesidad .....	12
2.1.1 Fisiopatología .....	14
2.1.2 Estrategias para el tratamiento y prevención.....	17
2.2 Naranja dulce ( <i>Citrus sinensis</i> ).....	18
2.2.1 Digestión y bioaccesibilidad de compuestos fenólicos .....	21
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	25
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	26
<b>VI. METODOLOGÍA</b> .....	27
6.1 Estrategia general del diseño experimental .....	27
6.2 Diseño de estudio .....	28
6.3 Obtención de la muestra.....	28
6.4 Digestión <i>in vitro</i> .....	28
6.5 Cuantificación e identificación de compuestos fenólicos .....	31
6.5.1 Extractos metanólicos.....	31
6.5.2 Determinación de Compuestos Fenólicos Totales.....	32
6.5.3 Caracterización de <i>Citrus sinensis</i> .....	34
6.6 Preparación del tratamiento celular .....	36
6.6.1 Extractos etanólicos.....	37
6.7 Cultivo celular 3T3-L1 .....	38
6.8 Viabilidad celular de los compuestos fenólicos bioaccesibles .....	39
6.9 Tratamiento celular .....	41
6.9.1 Tinción con rojo oleoso .....	42

<b>VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	44
<b>VIII. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD</b> .....	45
<b>IX. RECURSOS</b> .....	46
<b>X. RESULTADOS</b> .....	49
<b>XI. DISCUSIÓN</b> .....	61
<b>REFERENCIAS</b> .....	71
<b>ANEXOS</b> .....	87
Resumen Curricular.....	87

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
<b>Tabla 1.</b> Preparación de soluciones para digestión <i>in vitro</i> .....	30
<b>Tabla 2.</b> Concentraciones de ácido gálico para recta de calibración.....	33
<b>Tabla 3.</b> Contenido (mg EAG / 100 g de producto seco) y bioaccesibilidad (%IB) de compuestos fenólicos totales en naranja dulce ( <i>Citrus sinensis</i> ) antes y después de un proceso de digestión <i>in vitro</i> .....	49
<b>Tabla 4.</b> Características de los compuestos fenólicos identificados en <i>Citrus sinensis</i> por espectrometría de masas.....	50
<b>Tabla 5.</b> Contenido ( $\mu\text{g/g}$ de producto seco y bioaccesibilidad (%IB) de compuestos fenólicos de naranja dulce ( <i>Citrus sinensis</i> ) antes y después de un proceso de digestión <i>in vitro</i> .....	52

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
<b>Figura 1.</b> Porcentaje de obesidad en el mundo por género.....	12
<b>Figura 2.</b> Comparación del porcentaje de prevalencia de sobrepeso y obesidad en población de $\geq 20$ años entre 2012 y 2016 por género y a nivel nacional.....	13
<b>Figura 3.</b> Diferenciación de células madre mesenquimatosas en diferentes tipos celulares.....	15
<b>Figura 4.</b> Diferenciación de preadipocitos hacia adipocitos.....	16
<b>Figura 5.</b> Metabolismo de los flavonoides.....	22
<b>Figura 6.</b> Esquema general del diseño experimental.....	27
<b>Figura 7.</b> Esquema general del proceso de digestión <i>in vitro</i> estandarizado del consenso internacional (Minekus <i>et al.</i> , 2014) con modificaciones (Monente <i>et al.</i> , 2015).....	30
<b>Figura 8.</b> Temporalidad de ensayo de inhibición de adipogénesis.....	42
<b>Figura 9.</b> Temporalidad de ensayo de estimulación de lipólisis.....	42
<b>Figura 10.</b> Efecto de diferentes concentraciones de etanol (%) sobre la viabilidad de la línea celular 3T3-L1 a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento.....	55
<b>Figura 11.</b> Efecto de los compuestos fenólicos bioaccesibles (CFB) obtenidos de la digestión <i>in vitro</i> de naranja dulce ( <i>Citrus sinensis</i> ) sobre la viabilidad de la línea celular 3T3-L1 a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento.....	56
<b>Figura 12.</b> Células tratadas con compuestos fenólicos bioaccesibles (CFB) de naranja dulce ( <i>Citrus sinensis</i> ) obtenidos de un proceso de digestión <i>in vitro</i> y diálisis.....	58

<b>Figura 13.</b> Efecto sobre la acumulación lipídica en células 3T3-L1 tratadas con compuestos fenólicos bioaccesibles (CFB) de naranja dulce ( <i>Citrus sinensis</i> ) desde el inicio del ensayo hasta el día 21 (adipogénesis).....	59
<b>Figura 14.</b> Efecto sobre la acumulación lipídica en células 3T3-L1 tratadas con compuestos fenólicos bioaccesibles (CFB) de naranja dulce ( <i>Citrus sinensis</i> ) desde el día 12 del ensayo hasta el día 21 (lipólisis).....	60

## NOMENCLATURAS

<b>[M-H]<sup>-</sup></b>	Ion molecular cargado negativamente
<b>AFR</b>	África
<b>AMR</b>	América
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianzas
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de calcio
<b>CF</b>	Compuestos fenólicos
<b>CFB</b>	Compuestos fenólicos bioaccesibles
<b>CFT</b>	Compuestos fenólicos totales
<b>CIDICS</b>	Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud
<b>CIFA</b>	Centro de Investigación en Farmacobiología Aplicada
<b>CMM</b>	Células madre mesenquimatosas
<b>COBICIS</b>	Comité de Bioética en Investigación en Ciencias de la Salud
<b>CONACYT</b>	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
<b>DEM</b>	Desviación estándar de la media
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis letal media
<b>DMEM</b>	Medio “Dulbecco Modified Eagle’s”
<b>EAG</b>	Equivalentes de ácido gálico
<b>EC</b>	Energía de colisión
<b>EM</b>	Este del Mediterráneo
<b>ENSANUT</b>	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino
<b>EUR</b>	Europa

<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Food and Agriculture Organization)
<b>FDA</b>	Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration)
<b>FSG</b>	Fluido similar a fase gástrica
<b>FSI</b>	Fluido similar a fase intestinal
<b>FSS</b>	Fluido similar a saliva
<b>H7R</b>	Hesperetina-7-O-Rutinósido
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>HPLC-MS</b>	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas
<b>HSL</b>	Lipasa sensible a hormonas
<b>IB</b>	Índice de bioaccesibilidad
<b>IBMX</b>	Isobutilmetilxantina
<b>IMC</b>	Índice de Masa Corporal
<b>KCl</b>	Cloruro de potasio
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato de potasio monobásico
<b>LFH</b>	Lactasa-floricina hidrolasa
<b>m/z</b>	Relación masa/carga
<b>MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub></b>	Cloruro de magnesio hexahidratado
<b>MRM</b>	Monitoreo de reacción múltiple
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>2</sub></b>	Carbonato de amonio
<b>N7NH</b>	Naringenina-7-O-Neohesperidósido
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Carbonato de sodio
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de sodio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>ND</b>	No detectado



<b>OECD</b>	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OP</b>	Oeste de Pacífico
<b>PKA</b>	Proteína quinasa A
<b>PRODEP</b>	Programa para el Desarrollo Profesional del Docente
<b>SAGARPA</b>	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
<b>SEAS</b>	Sureste de Asia
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SGLT1</b>	Transportador de glucosa dependiente de sodio
<b>SM</b>	Solución madre
<b>SULT</b>	Sulfotransferasas
<b>TAB</b>	Tejido adiposo blanco
<b>TAM</b>	Tejido adiposo marrón
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral alfa
<b>TR</b>	Tiempo de retención
<b>UANL</b>	Universidad Autónoma de Nuevo León
<b>UGT</b>	UDP-glucoronosiltransferasas
<b>UNAV</b>	Universidad de Navarra

## RESUMEN

**Introducción:** Los compuestos fenólicos (CF) aislados de cítricos han demostrado tener un papel regulador sobre el desarrollo de obesidad (Gómez-Zorita *et al.*, 2017). Sin embargo, el efecto de los CF de naranja dulce (*Citrus sinensis*) después de un proceso digestivo *in vitro* no ha sido totalmente estudiado.

**Objetivo:** Evaluar la bioaccesibilidad *in vitro* de los compuestos fenólicos de naranja dulce (*Citrus sinensis*) y su efecto sobre la acumulación lipídica en células 3T3-L1.

**Metodología:** La pulpa liofilizada de naranja fue digerida según lo descrito por Minekus *et al.* (2014) con modificaciones (Monente *et al.*, 2015). Extractos metanólicos fueron utilizados para cuantificar los CF totales (CFT) en mg Equivalentes de Ácido Gálico (EAG)/100 g de producto seco y su bioaccesibilidad (%) por de método Folin-Ciocalteu, y para la caracterización por HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS. Posteriormente, la digestión intestinal fue dializada (Dinnella *et al.*, 2007) y liofilizada para extraer los CF bioaccesibles (CFB) con etanol al 80%. Se utilizó la línea celular 3T3-L1 para el estudio de viabilidad y selección de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) (Crouch *et al.*, 1993). Posteriormente, para evaluar el efecto en los mecanismos de adipogénesis y lipólisis, se realizó el tratamiento celular, según lo descrito por Torres-Villarreal *et al.* (2018), con dosis de 50-400 µg/mL de CFB. Los resultados son expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3) y un valor de  $p < 0.05$  fue considerado como significativo.

**Resultados:** La bioaccesibilidad de los CFT de naranja después de la digestión *in vitro* disminuyó significativamente un 25% (645.96 $\pm$ 11.95 a 487.36 $\pm$ 15.04 mg EAG/100 g) ( $p < 0.001$ ). Dieciséis CF fueron identificados y cuantificados en las muestras. El grupo de las flavanonas fue el más predominante (86%), siendo la Hesperetina-7-O-Rutinósido (H7R) y la Naringenina-7-O-Neohesperidósido (N7NH) los mayoritarios. Posterior a la digestión *in vitro*, la H7R y N7NH, disminuyeron significativamente un 19% y 39%, respectivamente, en relación a la muestra no digerida ( $p < 0.001$ ). Por otro lado, los ácidos hidroxicinámicos disminuyeron significativamente la bioaccesibilidad al 1% ( $p < 0.001$ ). Para el cultivo celular, se determinó la DL<sub>50</sub> a utilizar, siendo la concentración máxima de 400 µg/mL de CFB. En el efecto antiadipogénico, se obtuvo una disminución no significativa del 14% en la acumulación lipídica a una dosis de 150 µg/mL. Sin embargo, no se encontró una disminución significativa en el contenido lipídico en las células tratadas durante 10 días (lipólisis).

**Conclusiones:** La bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos de *C. sinensis* fue reducida significativamente después de la digestión *in vitro*. En ese sentido, el contenido de CF de *C. sinensis* depende de factores ambientales y su bioaccesibilidad disminuye después de un proceso de digestión *in vitro*.

## ABSTRACT

**Introduction:** Isolated phenolic compounds (PC) from citrus fruits have been demonstrated antiobesity properties (Gómez-Zorita *et al.*, 2017). However, the effect of Sweet orange (*Citrus sinensis*) after an *in vitro* digestive process has not been fully studied.

**Objective:** To assess the *in vitro* bioaccessibility of Sweet orange (*Citrus sinensis*) phenolic compounds and its effect on lipid accumulation in 3T3-L1 cells.

**Material and Methods:** Lyophilized orange simple was digested according to Minekus *et al.* (2014) and Monente *et al.*, 2015 with some modifications. Methanolic extracts were used to the quantification of Total Phenolic Content (TPC) by Folin-Ciocalteu method, expressed as mg Gallic acid equivalent (GAE) per 100 g of dry matter. Likewise, identification and quantification of PC were detected by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS. Simulating the passive diffusion of the PC, samples were dialyzed after intestinal digestion to obtain bioaccessible PC (BPC) (Dinnella *et al.*, 2007). BPC ethanolic extracts were used in 3T3-L1 cell line and cell viability was measured to identify lethal dose (LD<sub>50</sub>) (Crouch *et al.*, 1993). Different concentrations of BPC (50-400 µg/mL) were tested to assess the effect on adipogenesis and lipolysis according to Torres-Villarreal *et al.*, 2018. Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (n=3). A value of  $p < 0.05$  was set as statistically significant.

**Resultados:** The *in vitro* digestion process decreased by 25% the bioaccessibility of the PC in the intestinal phase (645.96 $\pm$ 11.95 a 487.36 $\pm$ 15.04 mg EAG/100 g) ( $p < 0.001$ ). Sixteen PC were identified and quantified in samples. The most abundant subgroup of PC before and after *in vitro* digestion were the flavonones (86%), Hesperetin-7-O-Rutinoside (H7R) and Naringenin-7-O-Neohesperidoside (N7NH) were the majority. After *in vitro* digestion, H7R and N7NH significantly decreased by 19% and 39%, respectively, compared with the undigested sample ( $p < 0.001$ ). On the other hand, bioaccessibility of hydroxycinnamic acids significantly decreased to 1% ( $p < 0.001$ ). The maximum concentration (LD<sub>50</sub>) obtained was 400 µg/mL to perform cell treatment. Lipid accumulation in cells induced to undergo adipogenesis and treated with BPC at a concentration of 150 µg/mL has a non- significant decrease of 14%. Moreover, no significant decrease in lipid content was found in the treated cells for 10 days (lipolysis).

**Conclusions:** BPC of *C. sinensis* was significantly reduced after *in vitro* digestion. In this regard, the PC content of *C. sinensis* depend on environmental factors and its bioaccessibility decreases after and *in vitro* digestion process.

## I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La obesidad ha incrementado su incidencia a nivel mundial, siendo México el segundo lugar de mayor prevalencia de sobrepeso y obesidad (Ribeiro, Pinto, Rafacho, Bosqueiro, Maeda, y Anselmo-Franci *et al.*, 2012; Organización Mundial de la Salud [OMS], 2018; OMS, 2016). Por lo anterior, se han evaluado nuevas estrategias y productos para la prevención y control de la obesidad (Nakajima, Alves y, Alves, 2014).

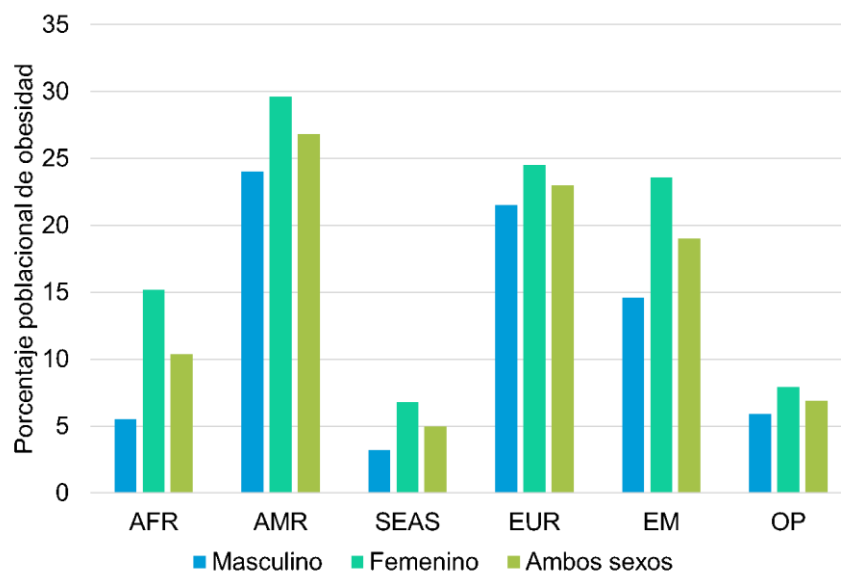
Una de las principales estrategias es la identificación de compuestos bioactivos presentes en los alimentos, como biomoléculas potencialmente implicadas en la prevención y control de la obesidad. Se ha reportado el efecto de compuestos bioactivos sobre la acumulación lipídica, actuando en paralelo con mecanismos implicados en la farmacoterapia de la obesidad, tales como inhibidores del apetito (Hamao, Matsuda, Nakamura, Nakashima, Semura, Maekubo, y Wakasugi *et al.*, 2011), estimulantes del gasto energético (Dulloo, 2011) e inhibidores de la digestión/absorción de nutrientes (de la Garza, Milagro, Boque, Campión, y Martínez, 2011). Sin embargo, existen pocos estudios sobre la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos y su efecto sobre mecanismos implicados en el desarrollo de obesidad.

En ese sentido, se han desarrollado métodos para el estudio de los compuestos fenólicos, su bioaccesibilidad y biodisponibilidad durante un proceso de digestión *in vitro*, simulando los procesos *in vivo*. De esta manera, se plantea la importancia del estudio del comportamiento de compuestos bioactivos de una matriz cítrica (*Citrus sinensis*) de mayor producción y consumo en Nuevo León, y su efecto en células sobre mecanismos implicados en el desarrollo de sobrepeso y obesidad.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Obesidad

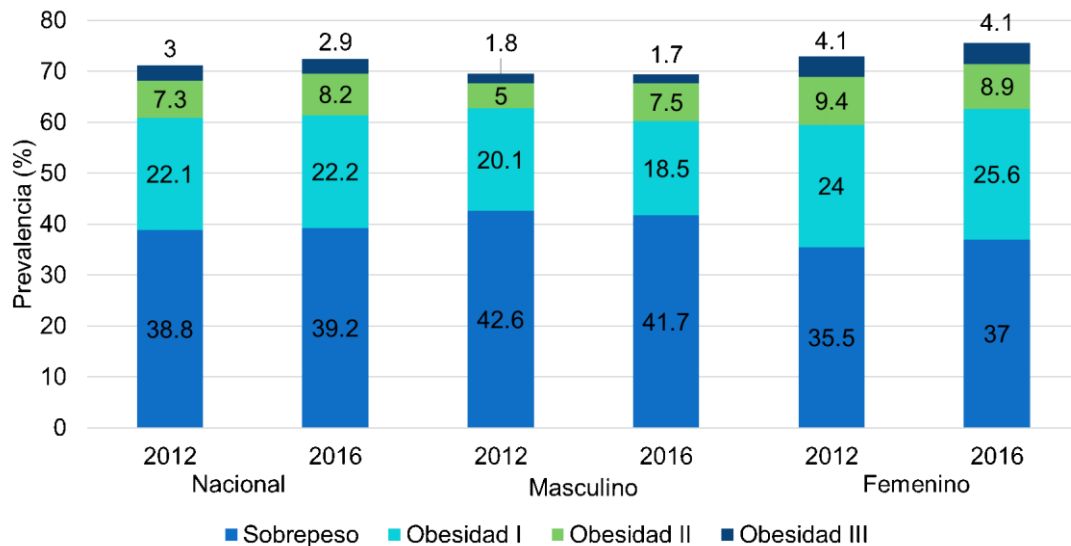
La obesidad es definida como la acumulación excesiva o anormal de tejido adiposo en el cuerpo que causa daños a la salud (OMS, 2016). Esta patología de origen multifactorial, en donde se ven implicados el sedentarismo, el consumo excesivo de alimentos densos en energía, la genética o problemas hormonales (Hossain Dayem, Han, Yin, Kim, y Saha *et al.*, 2016), es caracterizada por un estado de inflamación crónica, con una expansión de tejido adiposo resultante del incremento en número (hiperplasia) y tamaño (hipertrofia) de células adiposas (Tanti, Ceppo, Jager, y Berthou, 2013; Hardy, Czech, y Corvera, 2012).



**Figura 1.** Porcentaje de obesidad en el mundo por género. AFR: África; AMR: América; SEAS: Sureste de Asia; EUR: Europa; EM: Este del Mediterráneo; OP: Oeste del Pacífico. Modificada de OMS, 2016.

La OMS ha reportado en primer lugar en prevalencia de obesidad al continente americano (**Figura 1**) con una mayor prevalencia en mujeres (29.6%) en comparación a los hombres (24%), siendo el sureste de Asia el de menor índice de población con obesidad, con 6.8% en mujeres y 3.2% en hombres

(OMS, 2016). La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD) reportó una prevalencia del 32.4% en México, posicionándose como el segundo lugar a nivel mundial después de Estados Unidos (38.2%) (OECD, 2017).



**Figura 2.** Comparación del porcentaje de prevalencia de sobrepeso y obesidad en población  $\geq 20$  años entre 2012 y 2016 por género y a nivel nacional. Modificada de Secretaría de Salud, 2016.

En México, se ha observado un incremento en la prevalencia en la población adulta, combinada entre el sobrepeso y obesidad, de un 72.5% según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino (ENSANUT) en el 2016, en comparación con la ENSANUT 2012 (71.2%), sin ser estadísticamente significativa. La población femenina, según el Índice de Masa Corporal (IMC), tuvo menor porcentaje de sobrepeso (37%) en el 2016, siendo los hombres, la población con mayor prevalencia de sobrepeso (42.6%) pero menor en obesidad grado I, II y III (18.5%, 7.5% y 1.7%, respectivamente) (**Figura 2**) (Secretaría de Salud, 2016).

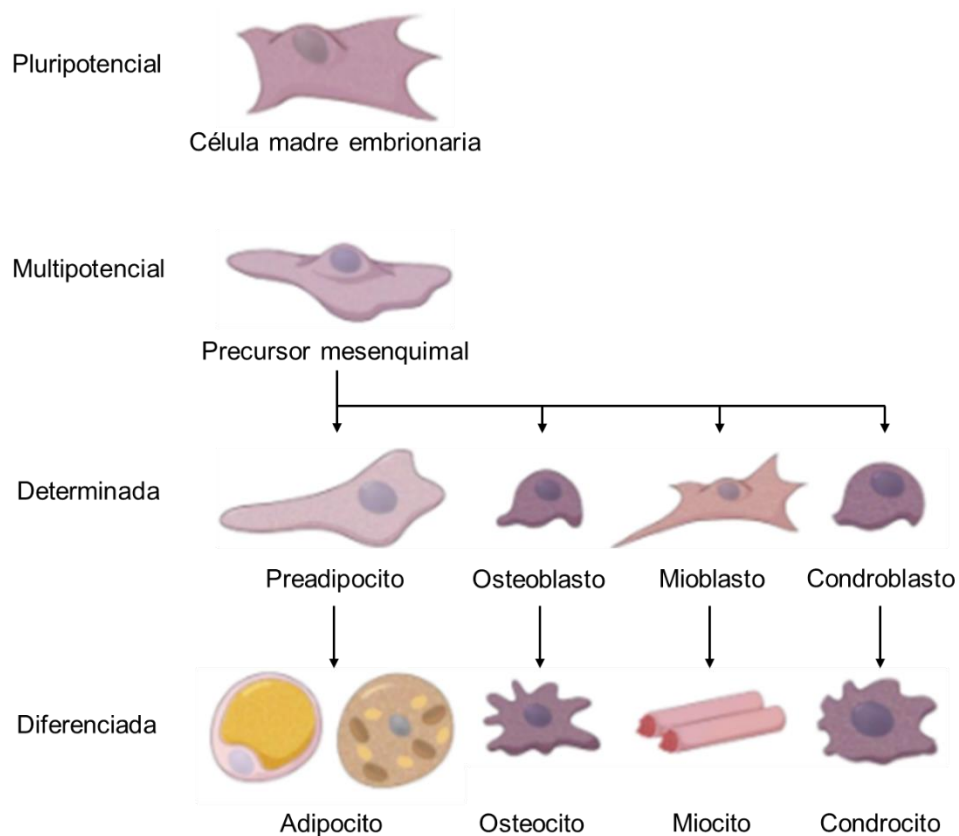
### 2.1.1 Fisiopatología

El tejido adiposo es un órgano dinámico que comprende del 4% al 40% de la composición corporal en adultos, compuesto adipocitos, preadipocitos, células endoteliales, macrófagos y fibroblastos (Ikeda, Maretich, y Kajimura, 2018; Tordjman, 2013; Hossain *et al.*, 2016).

En mamíferos, el tejido adiposo es compuesto por tejido adiposo blanco (TAB) y marrón (TAM), los cuales tienen distinta morfología, distribución y funciones metabólicas (Gómez-Hernández, Beneit, Díaz-Castroverde, y Escribano, 2016). El TAB se encuentra distribuido en el cuerpo humano en la grasa subcutánea proporcionando el aislamiento del calor o frío, y grasa visceral para la protección de órganos, subclasificada en retroperitoneal, mesentérica, omental o perigonadal, según su distribución en el cuerpo (Park, Kim, y Bae, 2014). Por otro lado, el TAM, se encuentra en la región interescapular, cervical, axilar y perirrenal en ratones y, supraclavicular, paraarterial y suprarrenal en seres humanos, siendo específico y eficiente para la producción y distribución de calor (Wang, y Seale, 2016; Park *et al.*, 2014).

El desarrollo y diferenciación del TAM comienza antes del nacimiento, para la protección al frío en el recién nacido (Park *et al.*, 2014; Carobbio, Guénantín, Samuelson, Bahri, y Vidal-Piug, 2019). Sin embargo, el desarrollo y diferenciación del TAB, comienza después del nacimiento por las células madres que residen en el estroma vascular del tejido adiposo, que al ser estimuladas, se someten a un proceso de compromiso de múltiples pasos en el que las células progenitoras se vuelven restringidas al linaje de los adipocitos, este reclutamiento del linaje da lugar a preadipocitos (Makki, Froguel, y Wolowczuk, 2013), que, al ser inducidos, se someten a múltiples ciclos mitóticos (expansión clónica mitótica) para diferenciarse en adipocitos (Tang, y Lane, 2012, Park *et al.*, 2014).

Los adipocitos son células derivadas de células madre mesenquimatosas (CMM), éstas son capaces de desarrollarse como miocitos, condrocitos y osteocitos (**Figura 3**) (Makki *et al.*, 2013; Peña, 2014). Además, juegan un rol dinámico importante en la regulación metabólica y son productores de adipocitocinas, las cuales afectan el consumo de nutrientes, metabolismo y gasto energético (Lafontan, 2011).

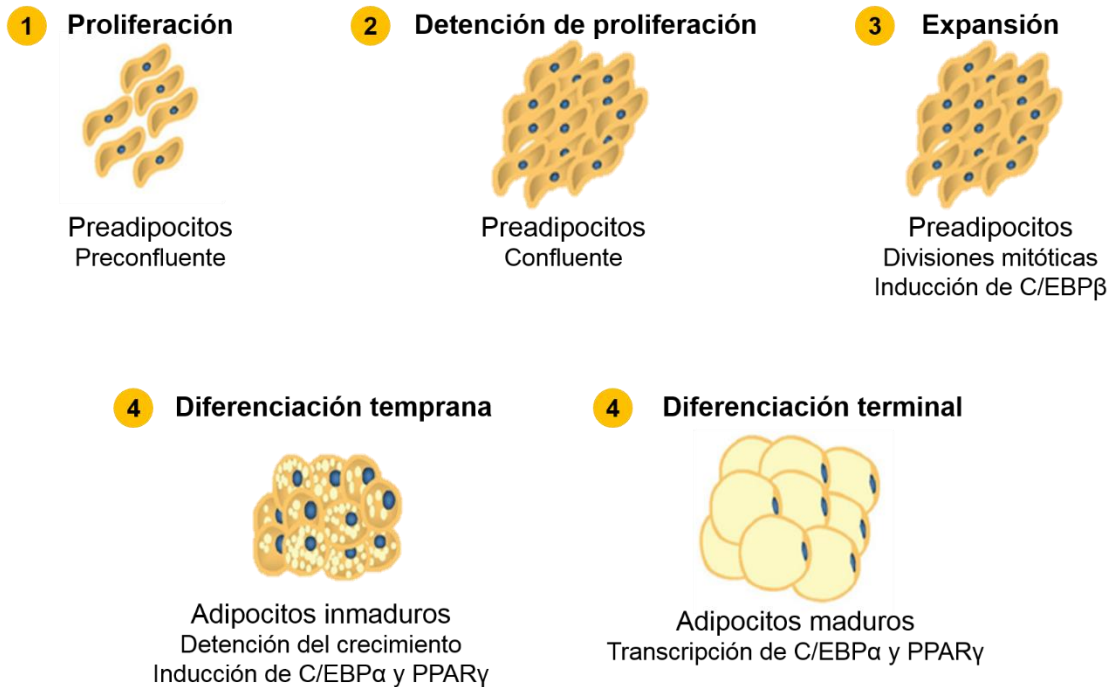


**Figura 3.** Diferenciación de células madre mesenquimatosas en diferentes tipos celulares. Obtenido de Peña, 2014.

La diferenciación de preadipocitos hacia adipocitos se ha estudiado en modelos celulares preadiposos de tejido adiposo blanco, como la línea celular 3T3-L1 (Esteve, 2014). El proceso de transición (**Figura 4**) inicia con la proliferación de los preadipocitos hasta su confluencia, seguido de una expansión clonal que induce señales hormonales y existe separación mitótica. Posteriormente, se inicia la diferenciación temprana en donde se detendrá la



división celular y se expresarán genes característicos del adipocito y se iniciará con la diferenciación terminal, que induce la transcripción de los genes de adipocitos maduros. Lo anterior es regulado por factores como el receptor nuclear PPAR $\gamma$  y c/EBP (Hu, Belaghzal, Hsiao, Bradner, Guertin, y Sif *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2014).



**Figura 4.** Diferenciación de preadipocitos hacia adipocitos. Modificada de Esteve, 2014.

La fase inicial de la adipogénesis es caracterizada por la proliferación de los preadipocitos, aumentando la acumulación lipídica (Park *et al.* 2014; Tang *et al.*, 2012). Este proceso está acompañado de la expresión de factores de transcripción y genes específicos como C/EBP, expresándose para el inicio de la expansión clónica mitótica y activando la expresión de PPAR $\gamma$  (Vinayagam, y Xu, 2015; Kim, Park, Woo, Kim, Koh, Min *et al.*, 2012).

La diferenciación de los adipocitos consta de dos fases (**Figura 4**); la diferenciación temprana inicia con el compromiso de los fibroblastos, que dará

lugar a los preadipocitos maduros, perdiendo la capacidad funcional de diferenciación y expresando marcadores tempranos de adipogénesis. Por otro lado, la diferenciación terminal consiste en la expresión de genes característicos de las células adiposas, estos cambios en la expresión y función de genes conducen a la adquisición fenotípica característica (Christodoulides, Lagathu, Sethi, y Vidal, 2009; Esteve, 2014).

Otros factores, como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), promueven la lipólisis y aumentan los ácidos grasos libres circulantes; la lipólisis descompone las gotas lipídicas compuestas por triacilglicéridos y colesterol (Vinayagam *et al.*, 2015). En condiciones alimenticias, las gotas lipídicas almacenan los triacilglicéridos en tejidos adiposos, en donde se hidrolizarán los enlaces éster entre los ácidos grasos de cadena larga y el glicerol, a lo que se denominará lipólisis, la cual consta de dos fases. La primera consiste en la fosforilación de uno de los miembros de las proteínas PAT y perilipina-1 (PLIN1) por la proteína quinasa A (PKA), conduciendo a una degradación proteosomal, iniciando la descomposición de los triacilglicéridos selectivamente, obteniendo diacilglicéridos y ácidos grasos libres. La segunda fase dependerá de la activación de la lipasa sensible a hormonas (HSL), la cual hidrolizará los diacilglicéridos y producirá monoacilglicéridos y ácidos grasos libres (Onal, Kutlu, Gozuacik, y Dokmeci, 2017).

### **2.1.2 Estrategias para el tratamiento y prevención**

Se han determinado estrategias para el control y pérdida de peso en individuos con obesidad, entre los cuales destaca un apoyo estructurado en el estilo de vida, que engloba aspectos como una modificación en la ingesta alimentaria, incremento de la actividad física, consumo de desayuno y programas de pérdida de peso (Fruh, 2017). La farmacoterapia es otro de los tratamientos utilizados en pacientes con obesidad, los cuales no hayan tenido éxito en

alcanzar metas de pérdida de peso y su IMC sea  $\geq 30$  o  $\geq 27$  kg/m<sup>2</sup> y con una comorbilidad asociada a la obesidad (Golden, 2017).

La fitoterapia se ha convertido en una alternativa terapéutica en el tratamiento de la obesidad, utilizando plantas medicinales o partes de ellas con fines terapéuticos (Colalto, 2018). Las matrices alimentarias vegetales contienen metabolitos secundarios como los flavonoides, desempeñando un papel positivo en el mantenimiento de homeostasis de mecanismos relacionados a la captación de glucosa, secreción de insulina, modulación de la función inmune y mantenimiento de glucosa en sangre (Vinayagam *et al.*, 2015).

Los flavonoides son pigmentos naturales que se encuentran en los vegetales, representan una clase de componentes biológicamente activos de metabolitos secundarios que forman parte de la dieta común del ser humano (Hajiaghaalipour, Khalilpourfarshbafi, y Arya, 2015).

## **2.2 Naranja dulce (*Citrus sinensis*)**

Las plantas cítricas y sus frutos como la naranja, mandarina, limones y limas son conocidos por su contenido rico en flavonoides (Alam, Subhan, Rahman, Uddin, Reza, y Sarker, 2014). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés), en el 2015, México se posicionó como el quinto productor más importante de naranjas (4, 158 toneladas por año), después de Brazil (16, 928 toneladas), China (6, 898 toneladas), India (6, 369 toneladas) y Estados Unidos (5, 778 toneladas), siendo la variedad Valencia el producto cítrico más común (FAO, 2017; Macías-Ojeda, Cervantes-Arista, Pelayo-Zaldivar, Escalona-Buendía, Alia-Tejacal, y Mendoza-Espinoza *et al.*, 2019).

La naranja dulce (*Citrus sinensis*) es un producto citrícola importante en México, siendo los principales productores los estados de Veracruz, San Luis

Potosí, Tamaulipas, Puebla y Nuevo León, concentrando un 84% del total nacional según la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) (Magdaleno-Hernández, García-Salazar, Omaña-Silvestre, Hernández-Romero y Cruz-Galindo, 2015). El cultivo en México se organiza en cadenas productoras de especies como la naranja dulce (*C. sinensis*) en regiones con climas tropicales húmedas o subhúmedas, especialmente en Montemorelos, donde nace la citricultura moderna en México (Rocha-Peña y Padrón-Chávez, 2009; Macías-Ojeda *et al.*, 2019). La naranja dulce contiene una variedad de fitoquímicos que incluyen a los polifenoles como, flavonoides y ácidos hidroxicinámicos, los cuales contribuyen al sabor y propiedades generales del fruto, siendo una fuente de metabolitos secundarios que contribuyen a actividades farmacológicas, como los flavonoides que se encuentran en la piel, hojas o la fruta entera (Nakajima *et al.*, 2014). Los flavonoides encontrados en el fruto son la naringenina, narirutina 4'-glucósido, hesperidina, narirutina, isosakuranetina, naringina, kaempferol-3-4'-di-o-hexósido (Favela-Hernández, González-Santiago, Ramírez-Cabrera, Esquivel-Ferriño y Camacho-Corona, 2016).

Se han reportado efectos de actividad lipolítica inducida por la naranja amarga (*Citrus aurantium*) (975 mg/día) en conjunto con cafeína (528 mg/día) y hierba de San Juan (900 mg/día), reduciendo la masa grasa corporal en humanos con obesidad, sin embargo, los efectos en la adipogénesis no han sido abordados completamente (Colker, Kalman, Torina, Perlis, y Street, 1999).

En un estudio realizado con células preadiposas 3T3-L1 de ratón tratadas con dosis de 10-50 µg/mL de extracto de *C. aurantium*, se encontró una inhibición en la diferenciación de preadipocitos de la línea celular 3T3-L1 hacia adipocitos, previniendo la acumulación lipídica, sin afectar la viabilidad de la célula en dosis mínimas de 10 µg/mL o máximas de 50 µg/mL. Por otro lado, la expresión de marcadores como PPARγ se regularon y disminuyeron durante la diferenciación (Kim *et al.*, 2012).

La naringenina, presente en frutas cítricas, ha demostrado una mejora en la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa, así como una disminución en las citocinas proinflamatorias en modelos animales diabéticos y alimentados con dieta obesogénica (Vinayagam *et al.*, 2015; Yoshida, Watanabe, Oomagari, Tsuruta, Shida, y Kurokawa, 2013). El kaempferol ha demostrado una reducción significativa en la expresión de PPAR $\gamma$  y c/EBP $\beta$  en tratamientos de 25  $\mu$ M, disminuyendo la cantidad de triacilgliceroles en dosis de 10 y 25  $\mu$ M en células preadiposas 3T3-L1 (Gómez-Zorita, Lasa, Abendaño, Fernández-Quintela, Mosqueda-Solís, y Garcia-Sobreviela *et al.*, 2017). En modelos de diferenciación de células preadiposas 3T3-L1 tratadas con 60 $\mu$ M de kaempferol, se encontró una inhibición del 62% de adipogénesis y una reducción del 39% de acumulación lipídica intracelular en adipocitos maduros, así como, la disminución significativa en la expresión de c/EBP $\alpha$  en comparación con aquellas que no fueron tratadas, sugiriendo un efecto antiadipogénico, al regular factores de transcripción claves en el proceso de adipogénesis (Torres-Villarreal, Camacho, Castro, Ortiz-Lopez, y de la Garza, 2018) .

Algunos de los flavonoides encontrados en fuentes cítricas (*C. aurantium*) como la hesperidina, han demostrado disminuir la generación de radicales libres y la liberación de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) en modelos celulares preadiposos; así como la reducción de estrés oxidativo, apoptosis y la mejora de la función cardíaca por la vía de PPAR $\gamma$  (Visnagri, Kandhare, Chakravarty, Ghosh, y Bodhankar, 2014; Agrawal, Sharma, Shrivastava, Ojha, Upadhya, y Arya *et al.*, 2014; Mahmound, Ashour, Abdel-Moneim, y Ahmed, 2012). En estudios previos, se demostró que la hesperidina disminuye el contenido de triacilglicéridos en dosis de 10 y 25  $\mu$ M, reduciendo significativamente la expresión de genes involucrados en las distintas fases de la adipogénesis en células 3T3-L1, tales como SREBP-1c, PPAR $\gamma$  y PLIN1 (Gómez-Zorita *et al.*, 2017).

Estudios previos en matrices cítricas, como la naranja dulce (*Citrus sinensis*), han sido realizados para la caracterización por cromatografía líquida de

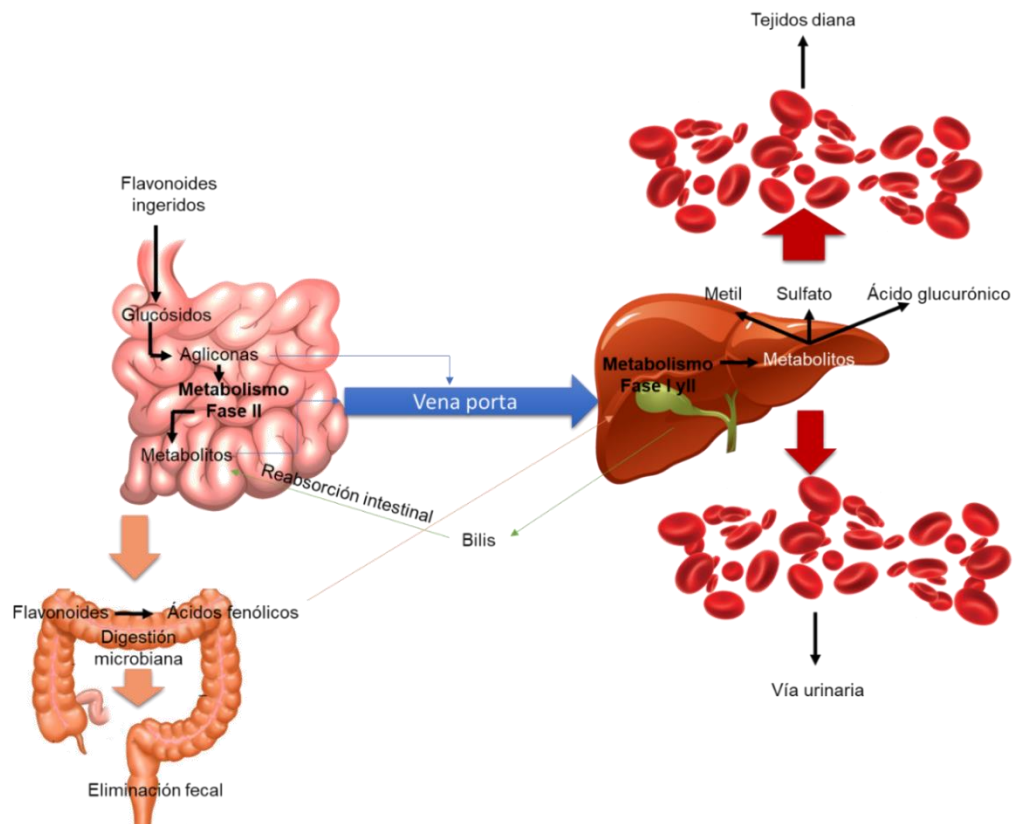
alta resolución acoplado a espectrometría de masas, encontrando mayoritariamente al grupo de las flavanonas con 85 a 95% como naringenina-7-O-rutinósido (naringina) y hesperetina-7-O-rutinósido (hesperidina), y minoritariamente al grupo de las flavonas con 3 a 8.8%, como la apigenina-6,8-di-C-glucósido y luteolina-6,8-di-C-glucósido, seguido de los ácidos flavonoles y ácidos hidroxicinámicos, presentes en 1 a 3.5% (Abad-García, Garmón-Lobato, Sánchez-Ilárduya, Berrueta, Gallo, y Vicente *et al.*, 2012).

### **2.2.1 Digestión y bioaccesibilidad de compuestos fenólicos**

En la digestión de compuestos, según la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés), se establecen dos definiciones a considerar: bioaccesibilidad, definida como la cantidad de un compuesto liberado de la matriz que será solubilizado en el quimo siendo disponible para su absorción; y biodisponibilidad, considerada como la cantidad liberada y absorbida que llegará a torrente sanguíneo y a sus diferentes destinos (FDA, 2012; Lucas-González, Viuda-Marios, Pérez-Álvarez y, Fernández-López, 2018). En la naranja se han encontrado compuestos antioxidantes, como los flavonoides, sin embargo, sólo una parte de ellos será disponible para su absorción, ya que no son degradados o liberados de la matriz alimentaria (Mennah-Govela, y Bornhorst, 2017).

Para evaluar el efecto de los flavonoides presentes en frutas cítricas sobre la acumulación lipídica, se han realizado estudios en compuestos aislados. Además, se han llevado a cabo estudios en cultivo celular con extractos naturales; sin embargo, los compuestos bioactivos sufren modificaciones durante la digestión (Bouayed, Hoffmann, y Bohn, 2011). Los polifenoles glucosilados pueden ser modificados en la cavidad oral por la actividad de la  $\alpha$ -amilasa. Por otro lado, el ambiente encontrado en la fase gástrica con la pepsina y el pH y finalmente en el intestino, con las bacterias y la enzima lactasa-floricina hidrolasa (LFH) (localizada en el borde en cepillo de células epiteliales, la cual tiene

especificidad por flavonoides-O- $\beta$ -D-glucósidos) liberarán la porción aglicona, al hidrolizar los flavonoides, para entrar a las células epiteliales por difusión pasiva (Duarte, y Pérez-Vizcaíno, 2015; Rodríguez-Mateos, Vauzour, Krueger, Shanmuganayagam, Reed, y Calani *et al.*, 2014). Existe otro mecanismo para la hidrólisis, el cual es mediado por una  $\beta$ -glucosidasa citosólica, pasando al transportador de glucosa dependiente de sodio (SGLT1) para hidrolizarlos intracelularmente (Duarte *et al.*, 2015).



**Figura 5.** Metabolismo de los flavonoides. Modificado de Thilakarathna, y Vasantha, 2013.

Los compuestos fenólicos que no son absorbidos pasan al colon donde serán metabolizados por la microbiota intestinal, en donde existen bacterias que son capaces de hidrolizar los compuestos fenólicos (Rodríguez-Mateos *et al.*, 2014). Al ser absorbidos siguen la ruta metabólica de sustancias orgánicas exógenas como fármacos y xenobióticos, sometiéndose al metabolismo enzimático fase II para la biotransformación y reacciones de conjugación, con mayor participación de enzimas como UDP-glucuronosiltransferasas (UGT),

sulfotransferasas (SULT), *N*-acetiltransferasas, glutatión *S*-transferasas, tiopurina *S*-metiltransferasa y catecol-*O*-metil transferasa. La fase II del metabolismo (**Figura 5**) ocurre en la pared del intestino delgado, para después pasar a través de la vena porta hacia el hígado para entrar a la circulación sistémica y eventualmente ser excretados por vía renal. Las bacterias del intestino grueso pueden hidrolizar los glucósidos, glucoronidasas, sulfatos, amidas, ésteres y lactonas y los esqueletos de flavonoides, en donde ocurre las reacciones de reducción, descarboxilación, metilación y dehidroxilación (Duarte *et al.*, 2015; del Rio, Rodriguez-Mateos, Spencer, Tognolini, Borges, y Crozier, 2013; Thilakarathna, y Vasantha, 2013).

En estudios previos, se ha reportado sobre flavonoides con estructuras complejas y de mayor peso molecular, presentando menor biodisponibilidad, como los glucósidos de genisteína en comparación con su forma aglicona, otro ejemplo sobre las clases de los flavonoides son los monoglucósidos, los cuales son absorbidos por el intestino delgado después de la hidrólisis por la LFH o  $\beta$ -glucosidasas citosólicas, sin embargo, los rutinósidos deben entrar a la microbiota intestinal antes de ser hidrolizados y absorbidos (Thilakarathna *et al.*, 2013; Bredsdorff, Nielsen, Rasmussen, Cornett, Barron, y Bouisset *et al.*, 2010). Otros factores que afectan la biodisponibilidad de los flavonoides ingeridos en la dieta, es la forma en la que se absorben y su estructura química (Thilakarathna *et al.*, 2013).

Aschoff *et al.* (2015), reportaron el contenido de flavonoides de la naranja antes y después de un proceso digestivo, siendo 8 veces menor la cantidad encontrada en jugo de naranja en comparación a pulpa y puré de naranja, debido a la eliminación de vesículas de la pulpa. Hou *et al.* (2018), realizaron estudios de digestión *in vitro* sobre los flavonoides y la actividad antioxidante de mandarinas, indicando que la cáscara de los cítricos es la fuente de mayor cantidad de flavonoides. Por otro lado, en un estudio realizado con jugo de naranja dulce de variedad Valencia y Navel, analizado desde el inicio de la



digestión hasta su término, para observar los cambios durante el proceso digestivo, se encontró un mayor contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) en la variedad Valencia (800 mg de Equivalentes de Ácido Gálico (EAG)/L) en comparación a Navel (709 mg EAG/L) antes de la digestión, pero menores después de la digestión (586 mg EAG/L y 658 mg EAG/L, respectivamente), obteniendo un total de 74% de compuestos fenólicos bioaccesibles (CFB) en variedad Valencia (Mennah-Govela *et al.*, 2017).

De Ancos *et al.* (2017), encontraron un contenido de CFT en la naranja dulce de 95 a 102 mg/100 g con un porcentaje de bioaccesibilidad de 29%, identificando mayoritariamente al grupo de las flavanonas, destacando a la hesperetina-7-O-rutinósido (hesperidina) y naringenina-7-O-rutinósido (narirutina). Las variaciones encontradas en la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos se han explicado por las diferencias entre métodos de digestión, al hacer uso de métodos de diálisis en la fase intestinal, reduciendo el porcentaje de CFB (Mennah-Govela *et al.*, 2017).

### III. JUSTIFICACIÓN

La obesidad es considerada una enfermedad multifactorial, caracterizada por el almacenamiento excesivo de grasa en el tejido adiposo, en donde están implicados mecanismos relacionados al metabolismo lipídico (adipogénesis y lipólisis). La prevalencia de sobrepeso y obesidad ha aumentado en todo el mundo, por lo que son necesarias acciones urgentes para prevenir y/o controlar la pandemia de la obesidad. En consecuencia, en los últimos años, se ha estudiado el efecto sobre la acumulación lipídica utilizando distintos extractos naturales y compuestos bioactivos aislados por diferentes métodos desde diversas partes de plantas y alimentos (Manning, Pucci, y Finer, 2014; Deng, y Scherer, 2010; Sun, Kusminski, y Scherer, 2011).

En estudios previos, se han utilizado flavonoides aislados de matrices cítricas como la *Citrus aurantium* en modelos celulares 3T3-L1, observando una regulación y disminución de la diferenciación adipocitaria en comparación a grupos sin tratamiento (Kim *et al.*, 2012). Sin embargo, al ser estudios con compuestos fenólicos aislados de la matriz alimentaria, es difícil simular el consumo habitual de estas moléculas y su bioaccesibilidad después de un proceso digestivo *in vitro*. De este modo, estos resultados no pueden ser trasladados a estudios clínicos, ya que no contemplan el proceso complejo de la digestión del organismo humano con sus fases de transformación mecánica y enzimática. Por otro lado, los modelos de digestión *in vitro* permiten simular las diferentes fases para la obtención de fracciones bioaccesibles y evaluar la biodisponibilidad de componentes bioactivos de matrices alimentarias, bajo condiciones específicas que permitan conocer el efecto de sus compuestos fenólicos sobre procesos de diferenciación adipocitaria y lipólisis para determinar dosis necesarias en materia de prevención y tratamiento de la obesidad.

## IV. HIPÓTESIS

Los compuestos bioactivos aislados, como los flavonoides, han demostrado tener efectos sobre la acumulación lipídica en células. Sin embargo, los resultados obtenidos no contemplan el proceso complejo de digestión humana. Por lo anterior, se planteó la siguiente hipótesis:

Los compuestos fenólicos de la naranja dulce (*Citrus sinensis*) disminuyen después de un proceso de digestión *in vitro*, así como el efecto sobre la acumulación lipídica en células 3T3-L1.

## V. OBJETIVOS

### General

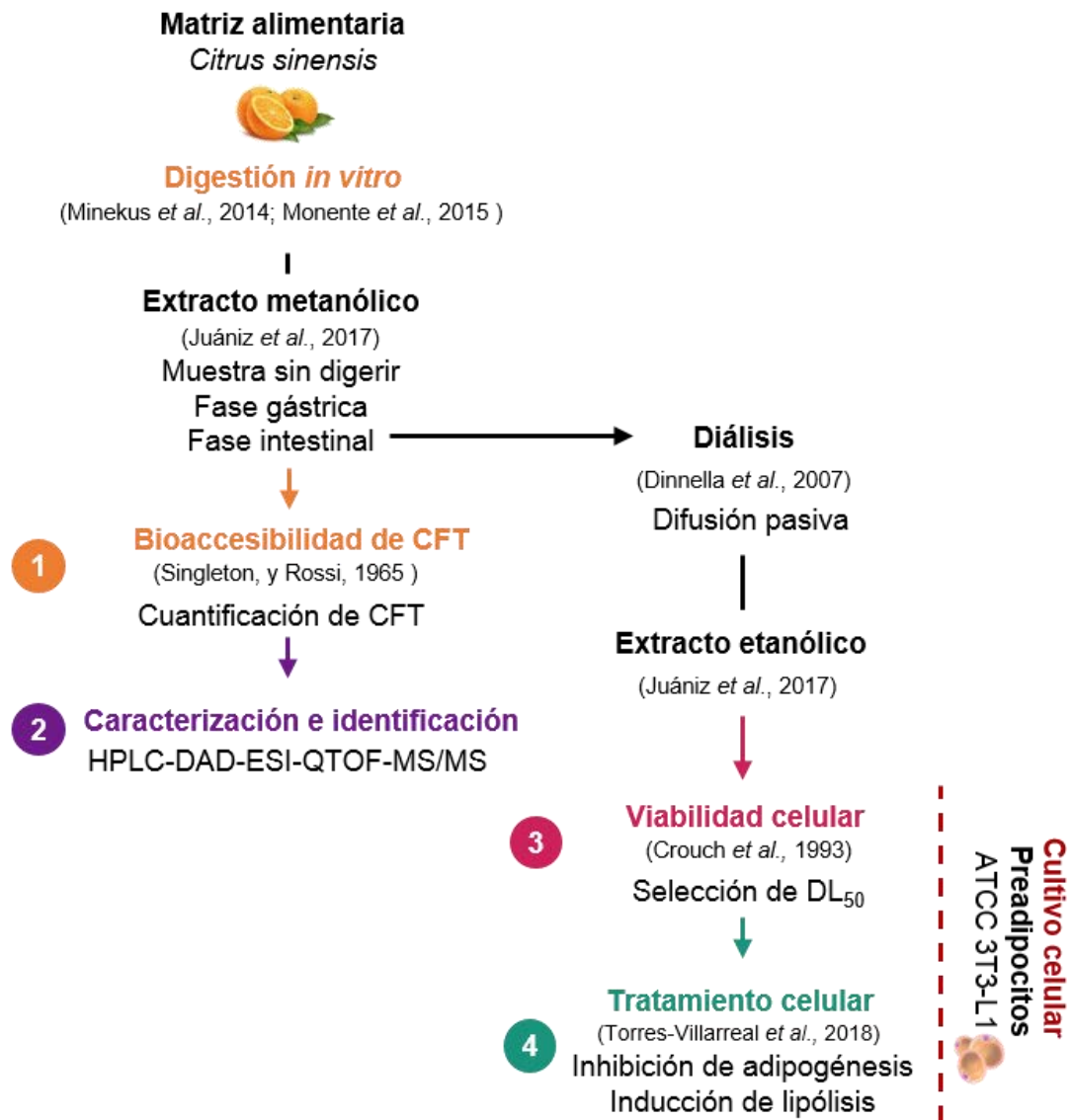
Evaluar la bioaccesibilidad *in vitro* de los compuestos fenólicos de naranja dulce (*Citrus sinensis*) y su efecto sobre la acumulación lipídica en células 3T3-L1.

### Específicos

1. Evaluar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos de *Citrus sinensis* a través de una digestión *in vitro*.
2. Identificar y cuantificar los compuestos fenólicos de *Citrus sinensis* durante un proceso de digestión *in vitro* por cromatografía de alta resolución (HPLC) acoplada a espectrometría de masas.
3. Determinar la DL<sub>50</sub> de los compuestos fenólicos bioaccesibles obtenidos por la digestión *in vitro* de *Citrus sinensis* en células 3T3-L1.
4. Analizar el efecto de los compuestos fenólicos bioaccesibles obtenidos por la digestión *in vitro* de *Citrus sinensis* sobre el proceso de diferenciación adipocitaria y estimulación de la lipólisis en células 3T3-L1.

## VI. METODOLOGÍA

### 6.1 Estrategia general del diseño experimental



**Figura 6.** Esquema general del diseño experimental. Elaboración propia. CFT, Compuestos Fenólicos Totales; DL<sub>50</sub>, Dosis Letal Media.

## 6.2 Diseño de estudio

El presente estudio descriptivo, experimental, transversal y correlacional, fue diseñado para evaluar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos de la naranja dulce (*Citrus sinensis*) antes y después de un proceso de digestión *in vitro*. Además, con este estudio se analizó el efecto de los compuestos fenólicos bioaccesibles sobre los procesos metabólicos implicados en el desarrollo de obesidad (adipogénesis y lipólisis) en células 3T3-L1.

## 6.3 Obtención de la muestra

La naranja dulce (*Citrus sinensis*) fue obtenida de la cosecha del verano 2018 de la región norte de México (coordenadas: 25° 11'13.99" N, 99° 49'36.01" O). La *C. sinensis* fue lavada con agua corriente, se retiró la cáscara, semillas y se cortaron en trozos para obtener la porción comestible. Posteriormente, la porción comestible de la muestra fue dividida en porciones de 75 gramos aproximadamente, envueltas en aluminio, sumergidas en nitrógeno líquido en tanque Thermo 10 tipo LN<sub>2</sub> Transfer Vessel (Thermo Scientific™) y almacenadas a -80°C hasta su liofilización. La porción comestible fue colocada en liofilizadora FreeZone 4.5 Liter (LABCONCO) en condiciones de 0.142 mBar a -52°C durante 120 horas, aproximadamente. La muestra liofilizada se procesó en molino GX4100 (KRUPS) hasta homogeneizar y se almacenó en recipientes ámbar a temperatura ambiente.

**Objetivo 1. Evaluar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos de *Citrus sinensis* a través de una digestión *in vitro*.**

## 6.4 Digestión *in vitro*

La digestión *in vitro* es un método utilizado para simular los procesos de la digestión *in vivo*, determinar la bioaccesibilidad de componentes presentes en

los alimentos y evaluar el comportamiento de las matrices alimentarias en el sistema gastrointestinal (Hur, Lim, Decker, y McClements, 2011; Petry, y Mercadante, 2017). Se realizó por triplicado un proceso de digestión *in vitro* estático estandarizado con modificaciones (**Figura 7**) (Minekus, Alming, Alvito, Ballance, Bohn, y Bourlieu *et al.*, 2014; Monente, Ludwig, Stalmach, de Peña, Cid, y Crozier, 2015).

### Reactivos

- $\alpha$ -amilasa de saliva humana [960 U/mg] (Sigma Aldrich)
- Pepsina de mucosa gástrica en polvo [722 U/mg] (Sigma-Aldrich)
- Extracto de bilis de origen porcino (Sigma-Aldrich)
- Pancreatina de origen porcino [4X USP] (Sigma-Aldrich)
- Cloruro de sodio (NaCl) (Sigma-Aldrich)
- Bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) (Sigma-Aldrich)
- Ácido clorhídrico 1M (HCl) (J. T. Baker)
- Cloruro de calcio 0.3M (CaCl<sub>2</sub>) (Jalmek)
- Cloruro de potasio (KCl) (Jalmek)
- Fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Jalmek)
- Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>) (CTR Scientific)
- Carbonato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (J. T. Baker)
- Hidróxido de sodio (NaOH) (Fermont)

### Equipo

- Potenciómetro MicropH 2000 (CRISON)
- Balanza granataria ST-510 (Series ST)
- Balanza analítica AG135 (METTLER TOLEDO)
- Agitador magnético múltiple 6-15 (VELP Scientifica)
- Baño y circulador de inmersión Polystat™ 24 (Thermo Scientific)

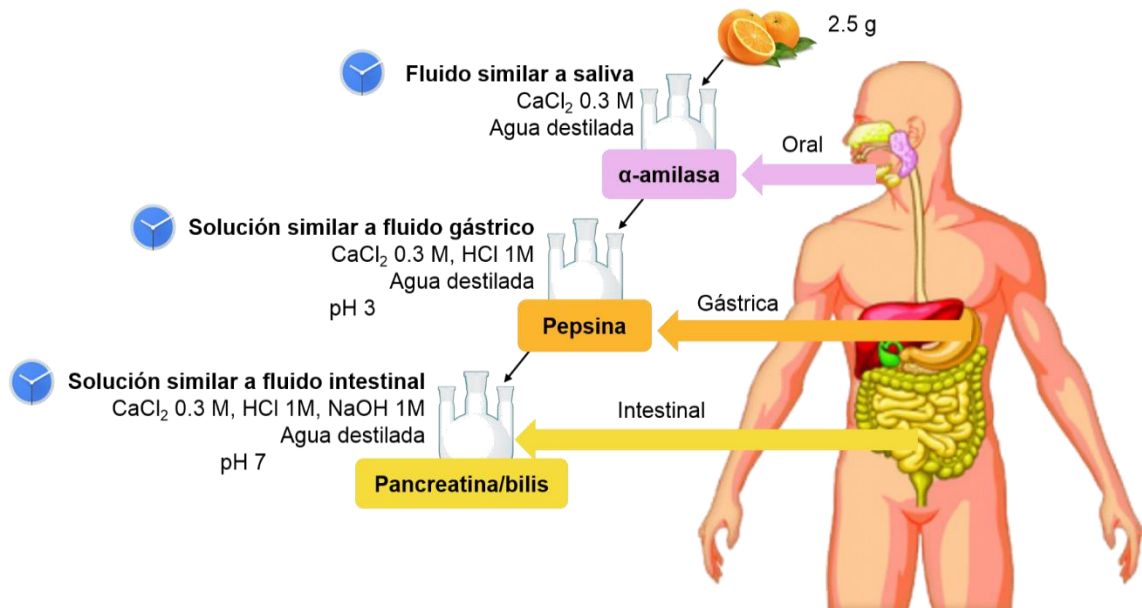
## Procedimiento

1. Se prepararon las soluciones similares a saliva (FSS), fase gástrica (FSG) e intestinal (FSI) (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Preparación de soluciones para digestión *in vitro*.

Compuesto	SM		FSS	FSG	FSI
	mol/L	(g/50mL)			
KCl	0.5	1.86	10.79	4.60	6.18
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5	3.40	2.64	0.60	0.73
NaHCO <sub>3</sub>	1	4.20	4.86	8.33	38.64
NaCl	2	5.84	-	7.87	8.73
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	0.2	1.52	0.36	0.22	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.5	2.40	0.04	0.33	-

SM, Solución Madre; FSS, Fluido similar a saliva; FSG, Fluido similar a fase gástrica; FSI, fluido similar a fase intestinal.



**Figura 7.** Esquema general del proceso de digestión *in vitro* estandarizado del Consenso Internacional (Minekus *et al.*, 2014) con modificaciones (Monente *et al.*, 2015). Elaboración propia.

2. **Digestión oral.** Se pesaron 2.5 gramos de *C. sinensis* liofilizada y homogeneizada y se añadió un volumen de 17.5 mL de FSS, 1.5 mL de

$\alpha$ -amilasa salival [13 mg/10 mL agua destilada], 125  $\mu$ L de  $\text{CaCl}_2$  0.3M y se aforó con agua destilada a 25 mL, colocándolo a baño maría a 37°C en agitación durante 30 minutos en oscuridad.

3. **Digestión gástrica.** Se añadieron 18.75 mL de FSG, 1.86 mL de pepsina [1g/10 mL HCL 1M], 12.5  $\mu$ L de  $\text{CaCl}_2$  0.3M y se aforó con agua a 25 mL. El pH se ajustó a 3 con HCl 1M, colocándolo a baño maría a 37°C en agitación durante 120 minutos en oscuridad.
4. **Digestión intestinal.** Se añadió un volumen de 27.5 mL de FSI, 12.5 mL de pancreatina [600 mg en 37.5 mL NaOH 1M y 37.5 mL agua destilada], 6.25 mL de extracto de bilis [625 mg en 12.5 mL NaOH 1M y 12.5 mL agua destilada], 100  $\mu$ L de  $\text{CaCl}_2$  0.3M y se aforó con agua destilada a 50 mL. El pH se ajustó a 7, colocándolo a baño maría a 37°C en agitación durante 120 minutos en oscuridad.
5. Se recolectó muestra de cada fase (sin digerir, gástrica e intestinal), se inactivaron las enzimas por choque térmico y se almacenaron a -80°C.

## 6.5 Cuantificación e identificación de compuestos fenólicos

Al finalizar la incubación en las fases de la digestión *in vitro*, se congeló a -80°C y fue liofilizada en Cryodos 50 (TELSTAR) con 0.190 mBar a 48°C. Posteriormente, se realizaron extractos metanólicos según lo descrito por Juániz *et al.* (2017) con metanol y agua acidificada (80:20) para la caracterización con HPLC-ESI-QTOF-DAD-MS/MS y la determinación de Compuestos Fenólicos Totales (CFT) por el método Folin-Ciocalteu (Singleton, y Rossi, 1965).

### 6.5.1 Extractos metanólicos

#### Reactivos

- Metanol grado HPLC 99.9% (PanReac, AppliChem ITW Reagents)
- Ácido fórmico 98% (PanReac, AppliChem ITW Reagents)



## Equipo

- Sonicador ULTRASONS-H (SELECTA)
- Centrífuga MIKRO 200 (HETTICH)
- Vórtex Heidolph (REAXtop)
- Balanza analítica AG135 (METTLER TOLEDO)

## Procedimiento

1. Se pesaron 25 mg de liofilizado de *C. sinensis* sin digerir, fase gástrica y fase intestinal en diferentes Eppendorf de 2 mL por triplicado.
2. Se añadieron 0.5 mL de metanol/agua acidificada (80:20) y se sonicó durante 90 minutos. Posteriormente, se centrifugó durante 10 minutos a 14000 rpm y se recolectó el sobrenadante (1).
3. Se añadieron 0.25 mL de metanol/agua acidificada (80:20) a los residuos sólidos, se centrifugó durante 10 minutos a 14000 rpm y se recolectó el sobrenadante (2).
4. Se mezcla el sobrenadante (1) y (2) en un tubo nuevo. Posteriormente, se filtró en OlimPeak de 0.2  $\mu\text{m}$  y se almacenó a -20 hasta su análisis.

### 6.5.2 Determinación de Compuestos Fenólicos Totales

Para determinar los CFT en la muestra sin digerir, en la fase gástrica e intestinal de la digestión *in vitro* se utilizó el método Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1965).

## Reactivos

- Reactivo Folin-Ciocalteu [1N] (Sigma-Aldrich)
- Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 20% (LabChem)
- Ácido gálico 97% (Sigma-Aldrich)
- Alcohol etílico 99.9% (PanReac)
- Extractos metanólicos sin digerir, gástrica e intestinal de *C. sinensis*

## Equipo

- Espectrofotómetro FLUOstar Omega (BMG LABTECH)

## Procedimiento

- a) Preparación de solución madre de ácido gálico [5mg/mL]
1. Se pesaron 250 mg de ácido gálico y se disolvieron en 50 mL de agua destilada.
- b) Para la curva de calibración:
1. Se colocaron 1185  $\mu$ L de agua destilada, 15  $\mu$ L de la concentración correspondiente de ácido gálico (**Tabla 2**), 75  $\mu$ L de Folin-Ciocalteu y se mezcló en vórtex.
  2. Al transcurrir 2 minutos, se añadió 225  $\mu$ L de solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 25%, se mezcló y dejó reaccionar en oscuridad a 20°C durante 2 horas.
  3. Se colocó en placa de 96 pocillos con 300  $\mu$ L de cada concentración por triplicado y se realizó la lectura en espectrofotómetro a 765 nm.

**Tabla 2.** Concentraciones de ácido gálico para curva de calibración.

Concentración		Solución madre
[ $\mu$ g/mL]	[mg/mL]	mL
5	0.005	0.01
10	0.01	0.02
25	0.025	0.05
50	0.05	0.1
100	0.1	0.2
200	0.2	0.4
300	0.3	0.6
600	0.6	1.2
2000	2	4

- a) Para los blancos:
1. Se colocaron 1200  $\mu$ L de agua destilada, 75  $\mu$ L de Folin-Ciocalteu

y se mezcló en vórtex.

2. Al transcurrir 2 minutos, se añadió 225 µL de solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 25%, se mezcló y dejó reaccionar en oscuridad a 20°C durante 2 horas.
3. Se colocó en placa de 96 pocillos con 300 µL de cada concentración por triplicado y se realizó la lectura en espectrofotómetro a 765 nm.

b) Para los extractos:

1. Se colocaron 1185 µL de agua destilada, 15 µL de los extractos, 75 µL de Folin-Ciocalteu y se mezcló en vórtex.
2. Al transcurrir 2 minutos, se añadió 225 µL de solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 25%, se mezcló y dejó reaccionar en oscuridad a 20°C durante 2 horas.
3. Se colocó en placa de 96 pocillos con 300 µL de cada concentración por triplicado y se realizó la lectura en espectrofotómetro a 765 nm.

**Objetivo 2. Identificar y cuantificar los compuestos fenólicos de *Citrus sinensis* durante un proceso de digestión *in vitro* por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS)**

### **6.5.3 Caracterización de *Citrus sinensis***

Para la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en la *C. sinensis* sin digerir, en la fase gástrica e intestinal del proceso de digestión *in vitro* se realizó el análisis en HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS.

#### **Reactivos**

- Metanol grado HPLC 99.9% (PanReac, AppliChem ITW Reagents)
- Ácido fórmico 98% (PanReac, AppliChem ITW Reagents)
- Acetonitrilo grado HPLC 99.9% (PanReac, AppliChem ITW Reagents)

- Apigenina-6,8-di-C-glucósido (Vicenin-2) (HWIGroup)
- Naringenina-7-O-rutinósido (Narirutin)  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich)
- Isosakuranetina-7-O-rutinósido (Didymin)  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich)
- Quercetin-3-rutinósido (Rutin) (Sigma-Aldrich)

## Equipo

- Unidad HPLC modelo 1200 (Agilent Technologies)
- Espectrómetro de masas con trampa iónica de triple cuadrupolo 3200 (AB Sciex)
- Columna CORTECS C18 (3 × 75 mm, 2.7  $\mu\text{m}$ ) (Waters)
- Balanza Excellence XS 204 (Mettler Toledo)

La fase móvil A fue ácido fórmico al 0.1% en agua destilada (v/v) y la fase móvil B fue acetonitrilo. Las inyecciones se tomaron a partir de 4  $\mu\text{L}$ , una temperatura de horno de columna de 30°C y un caudal de elución de 0.35 mL/min. La fase móvil A y B se establecieron con el programa reportado por De Santiago *et al.* (2019). Los análisis de masa se realizaron con ionización negativa, manteniendo el calentador a 500°C y un voltaje de pulverización iónica a -3500V. Se utilizaron presiones de 40, 50 y 35 psi de nitrógeno para el nebulizador, calentador y gas cortina, respectivamente. Se analizaron los cromatogramas con el Software Analyst 1.6.3 (AB Sciex).

Para la identificación de compuestos fenólicos, se realizó un análisis preliminar (SCAN) con m/z de 100 a 1000 y de productos de iones con m/z específicos en la función de monitoreo de reacción múltiple (MRM) respectivamente. Los compuestos fenólicos fueron estudiados con una primera transición con el fragmento más abundante (cuantificable) y una segunda transición con el ion calificador. Se utilizaron patrones para cuantificar los compuestos presentes y los compuestos tentativos en la muestra considerando los tiempos de retención (TR) y utilizando diferentes energías de colisión (EC).

## Procedimiento

- a) Preparación de solución madre de patrones [500 µg/mL]:
  1. Se pesaron 2.5 mg del patrón y se disolvió en 5 mL de agua acidificada/metanol (80:20) en balanza analítica, se repitió el procedimiento para todos los patrones).
  2. En viales para HPLC se colocaron 20 µL de cada patrón y se alcanzó un volumen de 200 µL de agua acidificada/metanol (80:20), con excepción del patrón de Vicenin-2.
    - o Para el patrón Vicenin-2 se colocaron 20 µL con un volumen de 80 µL de agua acidificada/metanol (80:20).
  
- b) Para la identificación de masas y preparación de rectas de calibración:
  1. Se prepararon soluciones intermedias [0.5, 5, 50 µg/mL] para realizar concentraciones de 0.0005 µg/mL a 50 µg/mL utilizadas en la recta de calibración.
  2. Se realizó lectura de la recta de calibración y la *C. sinensis* sin digerir, la fase gástrica e intestinal para cuantificar los compuestos fenólicos presentes por triplicado.

**Objetivo 3. Determinar la DL<sub>50</sub> de los compuestos fenólicos bioaccesibles obtenidos por la digestión *in vitro* de *Citrus sinensis* en células 3T3-L1.**

### 6.6 Preparación del tratamiento celular

Para la preparación del tratamiento celular, posterior a la digestión intestinal se realizó un proceso de diálisis descrito por Dinnella *et al.* (2007), añadiendo NaCl 9% en membrana de diálisis de éster de celulosa con anchura de 25 mm (Sigma-Aldrich), como solución fisiológica en recipiente con la digestión intestinal y se mantuvo en agitación durante 120 minutos a 37°C en oscuridad para simular la difusión pasiva de los compuestos fenólicos y obtener la fracción bioaccesible (CFB).

Al terminar la incubación, la digestión dializada se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se liofilizó en FreeZone 4.5 Liter (LABCONCO) en condiciones de 0.142 mBar a temperatura de  $-52^{\circ}\text{C}$  durante 120 horas o hasta su deshidratación y fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **6.6.1 Extractos etanólicos**

Para el tratamiento celular se realizó una extracción con etanol/agua destilada (80:20) (Juániz *et al.*, 2017) de la fase dializada de la digestión intestinal de la muestra.

#### **Reactivos**

- Alcohol etílico anhidro 99.9% (CTR Scientific)

#### **Equipo**

- Sonicador 5800 (BRANSON)
- Vórtex VWR
- Centrífuga C-40 (SOLBAT)
- Balanza analítica HR-150A (A&D Company, Limited)

#### **Procedimiento**

1. Se pesaron 25 mg de liofilizado de *C. sinensis* sin digerir, fase gástrica y fase intestinal en diferentes Eppendorf de 2 mL por triplicado.
2. Se añadieron 0.5 mL de etanol/agua acidificada (80:20) y se sonicó durante 90 minutos. Posteriormente, se centrifugó durante 10 minutos a 14000 rpm y se recolectó el sobrenadante (1).
3. Se añadieron 0.25 mL de etanol/agua acidificada (80:20) a los residuos sólidos, se centrifugó durante 10 minutos a 14000 rpm y se recolectó el sobrenadante (2).

4. Se mezcla el sobrenadante (1) y (2) en un tubo nuevo. Posteriormente, se filtró en ACRODISC 13 mm con membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

## **6.7 Cultivo celular 3T3-L1**

La línea celular preadipocitaria 3T3-L1 fue adquirida directamente de la American Type Culture Collection (ATCC) y se mantuvo según las pautas establecidas por el proveedor.

### **Reactivos**

- Medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) (Caisson)
- Suero fetal bovino (SFB) 10% (Gibco®)
- Tipsina-EDTA (1x) (Gibco®)
- Dexametasona (Adipogenesis Assay Dexamethasone Solution, Abcam)
- Insulina (Adipogenesis Assay Insulin Solution, Abcam)
- Isobutilmetilxantina (IBMX) (Cell Based Assay IBMX Solution, Abcam)
- Alcohol etílico desnaturalizado 40B (J.T Baker)

### **Equipo**

- Campana de flujo laminar clase II tipo A2 (LABCONCO)
- Estufa incubadora Series 8000 WJ CO<sub>2</sub> (Thermo Scientific™)
- Camara de Neubauer #3100 (Hausser Scientific)
- Centrifuga refrigerada 5810R (Eppendorf)
- Control de temperatura 37°C (PolyScience)
- Microscopio PrimoVert (Carl Zeiss)
- Microscopio Axio Lab.A1 (Carl Zeiss)

### **Procedimiento**

- a) Los medios de cultivo utilizados para la línea celular 3T3-L1 fueron preparados como se describe a continuación:

- Medio de mantenimiento: Medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de SFB.
- Medio de iniciación: Medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de SFB y 1  $\mu$ L/mL de IBMX, dexametasona e insulina.
- Medio de continuación: Medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de SFB y 1  $\mu$ L/mL de insulina.

b) Para el cultivo en frasco:

Las células se sembraron con una densidad inicial de 1000 células/cm<sup>2</sup> sobre frascos de cultivo T75 (CORNING™) con 10 mL de medio de mantenimiento. Se mantuvo a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, realizando el cambio de medio cada dos días.

Una vez alcanzada la confluencia de 60-80% se retiró el medio de cultivo y se despegaron las células con 7 mL de solución de Tripsina-EDTA al 0.25% y se incubaron durante 15 minutos. Al terminar la incubación, se añadieron 8 mL de medio y se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min a 20°C. El sobrenadante se eliminó y el pellet de células se resuspendió en 1 mL de medio de mantenimiento.

c) Cultivo en placa:

Al despegar las células con Tripsina-EDTA al 0.25% se realizó el conteo de células en cámara de Neubauer. Posteriormente, se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos (COSTAR) a una concentración de 2,500 células por pocillo. Se dejaron en 100  $\mu$ L de medio de mantenimiento durante 24 horas para la formación de monocapa confluyente.

## 6.8 Viabilidad celular de los compuestos fenólicos bioaccesibles

Los compuestos fenólicos bioaccesibles de *C. sinensis* después del proceso de digestión *in vitro* se sometieron a la determinación de viabilidad



celular mediante el sistema de luciferina/luciferasa descrito por Crouch *et al.* (1993), el cual estableció el número de células viables en el cultivo celular en base a la cuantificación de ATP presente, evidenciando las células metabólicamente activas y obteniendo las concentraciones a utilizar en el tratamiento de las células.

### **Reactivos**

- Kit CellTiter-Glo Luminiscent Cell Viability Assay (Promega)
  - Buffer CellTiter-Glo
  - Sustrato CellTiter-Glo

### **Equipo**

- Luminómetro Turner BioSystems Veritas (Promega)
- Campana de flujo laminar clase II tipo A2 (LABCONCO)
- Estufa incubadora Series 8000 WJ CO<sub>2</sub> (Thermo Scientific™)
- Control de temperatura 37°C (PolyScience)

### **Procedimiento**

a) Para la preparación del reactivo:

1. Se descongeló el Buffer CellTiter-Glo para equilibrar a temperatura ambiente dos horas antes del ensayo.
2. Se equilibró el sustrato liofilizado CellTiter-Glo a temperatura ambiente.
3. Se transfirió el volumen del buffer a la botella del sustrato para reconstruir la enzima y formar el reactivo CellTiter-Glo.

b) Ensayo de viabilidad:

Se cultivaron células 3T3-L1 en tres placas opacas independientes de 96 pocillos con concentraciones de compuestos fenólicos bioaccesibles de 50, 150, 200, 300 y 400 µg/mL para el análisis de viabilidad durante 24,

48 y 72 horas. Se utilizó el control negativo con medio mantenimiento y sin tratamiento.

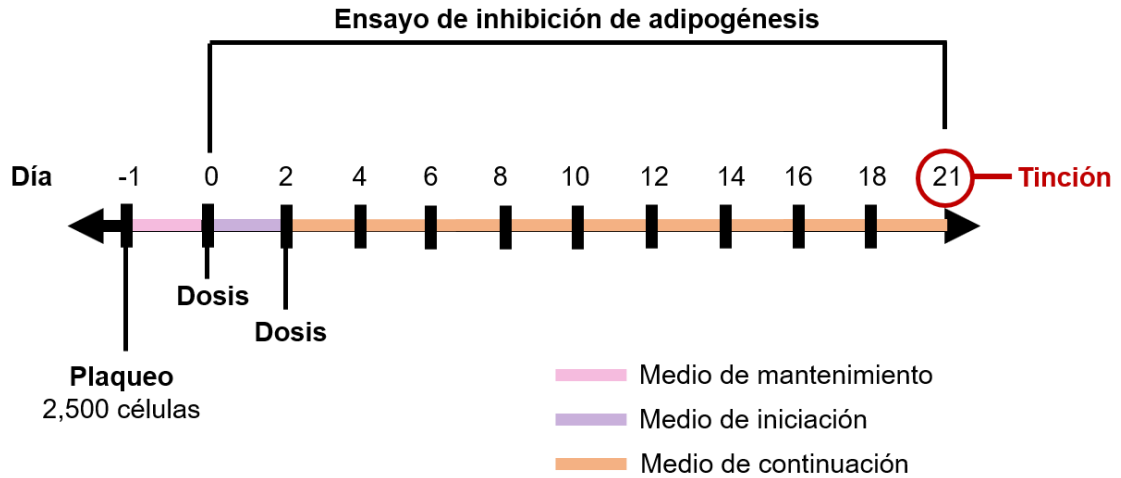
1. Se colocó a temperatura ambiente la placa durante 30 minutos y se extrajo el medio de cultivo.
2. Se añadieron 100  $\mu$ L del reactivo CellTiter-Glo y se mezclaron los componentes durante 2 minutos para inducir la lisis celular.
3. Se incubó durante 10 minutos para estabilizar la señal luminiscente y se cuantificó la energía lumínica en el luminómetro.

**Objetivo 4. Analizar el efecto de los compuestos fenólicos bioaccesibles obtenidos por la digestión *in vitro* de *Citrus sinensis* sobre el proceso de diferenciación adipocitaria y estimulación de la lipólisis en células 3T3-L1.**

## **6.9 Tratamiento celular**

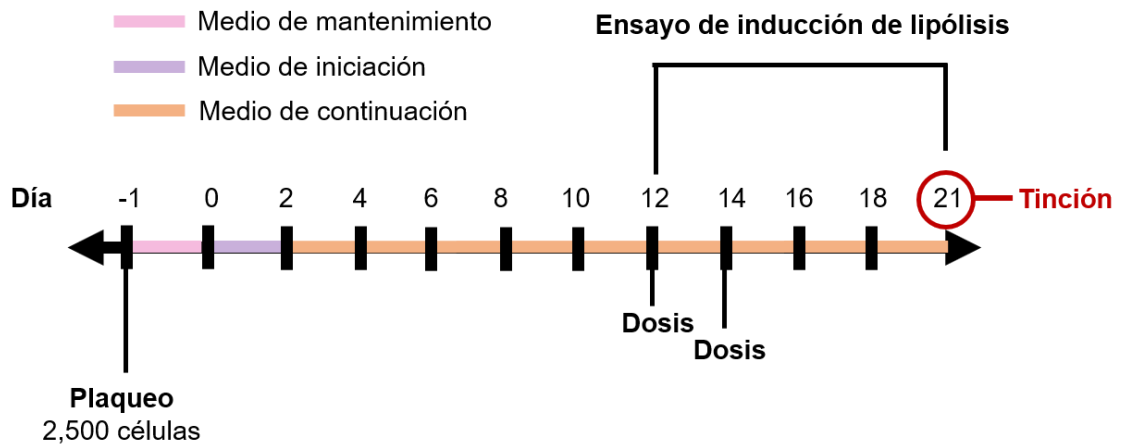
Las células se sembraron en placa con 2,500 células por pocillo para los ensayos de inhibición de adipogénesis y la inducción de lipólisis basado en el método descrito por Torres-Villarreal *et al.* (2018). Se utilizó medio de mantenimiento (DMEM suplementado con 10% (v/v) de SFB) para el control negativo durante todo el ensayo y medio iniciación (DMEM suplementado con 10% (v/v) de SFB y 1  $\mu$ L/mL de IBMX, dexametasona e insulina) para el control positivo al iniciar la diferenciación y, posteriormente, con medio de continuación (DMEM suplementado con 10% (v/v) de SFB y 1  $\mu$ L/mL de insulina) cada dos días.

Para la inhibición de adipogénesis, las células se incubaron con los compuestos bioaccesibles a partir del día 0 con medio de iniciación a dosis de 50 a 400  $\mu$ g/mL de CFB, y, en cada cambio de medio se añadieron las dosis correspondientes hasta completar los 21 días (**Figura 8**).



**Figura 8.** Temporalidad de ensayo de inhibición de adipogénesis. Elaboración propia.

Para la inducción de lipólisis, se mantuvieron las células desde el día 0 con medio de iniciación y cada dos días con medio de continuación hasta el día 12, en donde se añadieron las dosis correspondientes de 50 a 400  $\mu\text{g/mL}$  de CFB cada dos días hasta completar los 21 días desde su inicio (**Figura 9**).



**Figura 9.** Temporalidad de ensayo de estimulación de lipólisis. Elaboración propia.

### 6.9.1 Tinción con rojo oleoso

El rojo oleoso (*Oil Red O*) es un colorante histoquímico, el cual se utiliza para evaluar la cantidad de lípidos neutros en células diferenciadas a adipocitos,

representativo del grado de diferenciación adipocitaria (Ramírez-Zacarías, Castro-Muñozledo, y Kuri-Harcuch, 1992). Para la cuantificación de inhibición adipogénesis e inducción de lipólisis se utilizó *Oil red O* y se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 495 nm. Se utilizaron los reactivos proporcionados por el kit Adipogenesis Assay Kit Cell-Based (Abcam).

### **Reactivos**

- Lipid Droplets Assay Fixative (10X)
- Lipid Droplets Assay Wash Solution
- Lipid Droplets Assay Oil Red O Solution
- Lipid Droplets Assay Dye Extraction Solution

### **Equipo**

- Microscopio óptico invertido (Carl Zeiss)
- Espectrofotómetro iMark Microplate Reader (BIO-RAD)

### **Procedimiento**

1. Se retiró el medio de cultivo de las células diferenciadas y se agregaron 75  $\mu$ L de la solución fijadora Lipid Droplets Assay Fixative, se dejó reposar la solución por 15 minutos.
2. Se lavó por duplicado con 100  $\mu$ L de la solución Lipid Droplets Assay Wash Solution, se colocó en reposo la solución por 5 minutos entre lavados y se dejó secar al final.
3. Se les adicionó la solución Lipid Droplets Assay Oil Red O Solution y se dejó reposar durante 20 minutos.
4. Se eliminó la tinción mediante tres lavados utilizando 100  $\mu$ L de la solución Lipid Droplets Assay Wash Solution.
5. Se extrajo el colorante mediante la adición de 100  $\mu$ L de la solución Lipid Droplets Assay Dye Extraction Solution.
6. Se cuantificó la absorbancia en el espectrofotómetro a 495 nm, y analizó por triplicado.

## VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los procesos de digestión *in vitro* de *C. sinensis* se realizaron por triplicado para el análisis de compuestos fenólicos en la muestra y el tratamiento celular. Los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (DEM). Se realizó Análisis de Varianzas (ANOVA) para comprobar si existen diferencias significativas y la prueba *post-hoc* de Tukey para confirmar las diferencias significativas entre las distintas fases de la digestión. Se consideraron significativos los valores de  $p < 0.05$ . Para el análisis estadístico se utilizó el software estadístico IBM SPSS Statistics 22.0.

## VIII. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD

El proyecto de investigación se apegó a las condiciones y lineamientos de los laboratorios de la unidad de nutrición y genómica establecidos por el Comité Institucional de Bioseguridad del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) y por el Comité de Bioética en Investigación en Ciencias de la Salud (COBICIS) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Los comités se apegan a las disposiciones emitidas por organismos nacionales e internacionales en materia de investigación y establecen pautas a seguir para el adecuado manejo de material biológico como cultivos celulares, dentro de estos lineamientos destacan:

- Se deberá contar con la indumentaria apropiada como bata y guantes, los cuales serán portados en todo momento.
- Se deberán mantener abastecidos frascos aspersores con soluciones de descontaminación.
- Se deberá contar con un estuche de desechos biológicos específicos para las líneas celulares.
- Al inicio y término de la jornada laboral se deberán limpiar las áreas de trabajo correspondientes al cuarto de cultivo.
- Únicamente pueden ser utilizadas pipetas, micropipetas, puntillas, frascos de cultivo o cualquier otro material destinado a cultivo celular que haya sido previamente esterilizado.
- Cualquier material utilizado para la manipulación del cultivo celular deberá ser desechado en el bote de residuos biológicos.

## IX. RECURSOS

El proyecto se desarrolló en dos instalaciones, la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) y la Universidad de Navarra (UNAV). El proceso de digestión *in vitro*, así como la cuantificación e identificación de los compuestos fenólicos, fueron realizados en el Centro de Investigación en Farmacobiología Aplicada (CIFA) UNAV. Por otro lado, el proceso de diálisis se realizó en la Unidad de Nutrición, y los procesos relacionados al cultivo y tratamiento celular en la Unidad de Genómica del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la UANL. A continuación, se enlistan los recursos utilizados:

### Equipos

- Agitador magnético múltiple 6-15 (VELP Scientifica)
- Balanza analítica AG135 (METTLER TOLEDO)
- Balanza analítica HR-150A (A&D Company, Limited)
- Balanza Excellence XS 204 (Mettler Toledo)
- Balanza granataria ST-510 (Series ST)
- Baño y circulador de inmersión Polystat™ 24 (Thermo Scientific)
- Campana de flujo laminar clase II tipo A2 (LABCONCO)
- Centrífuga C-40 (SOLBAT)
- Centrífuga MIKRO 200 (HETTICH)
- Centrífuga refrigerada 5810R (Eppendorf)
- Control de temperatura 37°C (PolyScience)
- Espectrofotómetro FLUOstar Omega (BMG LABTECH)
- Espectrofotómetro iMark Microplate Reader (BIO-RAD)
- Espectrofotómetro Multiskan GO UV/VIS Microplate (Thermo Scientific™)
- Espectrómetro de masas con trampa iónica de triple cuadrupolo (AB Sciex)
- Estufa incubadora Series 8000 WJ CO<sub>2</sub> (Thermo Scientific™)

- Liofilizadora Cryodos 50 (TELSTAR)
- Liofilizadora FreeZone 4.5 Liter Benchtop (LABCONCO)
- Luminómetro Turner BioSystems Veritas (Promega)
- Microscopio Axio Lab.A1 (Carl Zeiss)
- Microscopio PrimoVert (Carl Zeiss)
- Molino para café GX4100 (KRUPS)
- Potenciómetro MicropH 2000 (CRISON)
- Sonicador 5800 (BRANSON)
- Sonicador ULTRASONS-H (SELECTA)
- Unidad HPLC modelo 1200 (Agilent Technologies)
- Vórtex Heidolph (REAXtop)
- Vórtex VWR

### **Reactivos y muestras**

- Línea celular 3T3-L1 (American Type Culture Collection, ATCC)
- Matriz alimentaria: *Citrus sinensis*
- $\alpha$ -amilasa de saliva humana [960 U/mg] (Sigma Aldrich)
- Pepsina de mucosa gástrica en polvo [722 U/mg] (Sigma-Aldrich)
- Extracto de bilis de origen porcino (Sigma-Aldrich)
- Pancreatina de origen porcino [4X USP] (Sigma-Aldrich)
- Cloruro de sodio (NaCl) (Sigma-Aldrich)
- Bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) (Sigma-Aldrich)
- Ácido clorhídrico 1M (HCl) (J. T. Baker)
- Cloruro de calcio 0.3M (CaCl<sub>2</sub>) (Jalmek)
- Cloruro de potasio (KCl) (Jalmek)
- Fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Jalmek)
- Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>) (CTR Scientific)
- Carbonato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (J. T. Baker)
- Hidróxido de sodio (NaOH) (Fermont)
- Metanol grado HPLC 99.9% (PanReac, AppliChem ITW Reagents)



- Ácido fórmico 98% (PanReac, AppliChem ITW Reagents)
- Reactivo Folin-Ciocalteu [1N] (Sigma-Aldrich)
- Carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 20% (LabChem)
- Ácido gálico 97% (Sigma-Aldrich)
- Alcohol etílico 99.9% (PanReac)
- Acetonitrilo grado HPLC 99.9% (PanReac, AppliChem ITW Reagents)
- Apigenina-6,8-di-C-glucósido (Vicenin-2) (HWIGroup)
- Naringenina-7-O-rutinósido (Narirutin) ≥98% (Sigma-Aldrich)
- Isosakuranetina-7-O-rutinósido (Didymin) ≥98% (Sigma-Aldrich)
- Quercetin-3-rutinósido (Rutin) (Sigma-Aldrich)
- Medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) DML10-500ML (Caisson)
- Suero fetal bovino (SFB) 10% (Gibco®)
- Tipsina-EDTA (1x) (Gibco®)
- Dexametasona (Adipogenesis Assay Dexamethasone Solution, Abcam)
- Insulina (Adipogenesis Assay Insulin Solution, Abcam)
- Isobutilmetilxantina (IBMX) (Cell Based Assay IBMX Solution, Abcam)
- Alcohol etílico anhidro 99.9% (CTR Scientific)
- Kit CellTiter-Glo Luminiscent Cell Viability Assay (Promega)
- Kit Adipogenesis Assay Kit Cell-Based (Abcam)

## **Financieros**

El proyecto, con número de registro 16-FaSPyN-SA-10, fue financiado por el Programa para el Desarrollo Profesional del Docente, para el Tipo Superior (PRODEP).

## **Humanos**

Investigadores de la Unidad de Nutrición y Genómica del CIDICS, así como investigadores, estudiantes de doctorado y auxiliares de laboratorio de la Unidad de Nutrición y Bromatología de la UNAV.

## X. RESULTADOS

### Objetivo 1. Evaluar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos de *Citrus sinensis* a través de una digestión *in vitro*.

El contenido de compuestos fenólicos totales de la pulpa de naranja dulce (*C. sinensis*) y su bioaccesibilidad durante el proceso de digestión *in vitro* se muestran en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Contenido (mg EAG / 100 g de producto seco) y bioaccesibilidad (%IB) de compuestos fenólicos totales en naranja dulce (*Citrus sinensis*) antes y después de un proceso de digestión *in vitro*.

Fase de digestión	Compuestos fenólicos totales	
	mg EAG / 100 g	%IB
No digerido	645.95 ± 11.95 <sup>a</sup>	ND
Fase gástrica	618.60 ± 7.73 <sup>a</sup>	96
Fase intestinal	487.36 ± 15.04 <sup>b</sup>	75

Los resultados son expresados como media ± desviación estándar ( $n=3$ ). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de un factor y Tukey como prueba *post hoc*. En cada parámetro, letras en superíndice diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ( $p<0.05$ ). EAG: Equivalentes de Ácido Gálico; ND: No detectado.

Los Compuestos Fenólicos Totales (CFT) obtenidos de la pulpa de *C. sinensis* sin digerir (645.95 ± 11.95 mg EAG/100 g de producto seco) disminuyeron significativamente en la fase intestinal de la digestión *in vitro* (487.36 ± 15.04 mg EAG/100 g producto seco) ( $p<0.001$ ). En ese sentido, se observó una disminución del 25% de los Compuestos Fenólicos Bioaccesibles (CFB).

**Objetivo 2. Identificar y cuantificar los compuestos fenólicos de *Citrus sinensis* durante un proceso de digestión *in vitro* por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS)**

Se identificaron dieciséis Compuesto Fenólicos (CF) antes y después del proceso de digestión *in vitro* de *C. sinensis*. Las características obtenidas de los CF identificados por HPLC acoplado a masas se observan en la **Tabla 4**. El contenido y bioaccesibilidad de los CF de *C. sinensis* antes y después de un proceso de digestión *in vitro* se observan en la **Tabla 5**.

**Tabla 4.** Características de los compuestos fenólicos identificados en *Citrus sinensis* por espectrometría de masas.

Compuesto	Fórmula química	TR (min)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	EC	Iones fragmentados
<b>Ácidos hidroxicinámicos</b>					
Ácido ferúlico-O-Hexósido	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	3.98	355	-20	175 / 193 / 217 / 149
Ácido sinápico	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	4.33	385	-30	205 / 190 / 233 / 164 / 175
<b>Flavonoles</b>					
Quercetina-3-O-Rutinósido-7-O-Glucósido	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>21</sub>	5.79	771	-45	301 / 463 / 609
Miricetina-3-Rutinósido	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	5.10	625	-40	317 / 289 / 597 / 299 / 326
Isorhamnetin-7-O-Rutinósido	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	6.63	623	-40	315 / 314 / 300
Isorhamnetin-3-O-hexósido-7-O-ramnosilhexósido	C <sub>34</sub> H <sub>42</sub> O <sub>21</sub>	5.06	785	-40	623 / 315 / 151

TR, Tiempo de retención; m/z, Relación masa/carga; [M-H]<sup>-</sup>, Ion molecular cargado negativamente; EC, Energía de colisión

**Continuación Tabla 4.** Características de los compuestos fenólicos identificados en *Citrus sinensis* por espectrometría de masas.

Compuesto	Fórmula química	TR (min)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	EC	Iones fragmentados
<b>Flavanonas</b>					
Isosakuranetin-7-O-Rutinósido	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>14</sub>	9.46	595	-30	285 / 309 / 327
Naringenina-7-O-Rutinósido	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	6.58	579	-25	271
Naringenina-7-O-Neohesperidósido	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	6.48	579	-35	271 / 579 / 151 / 295 / 313
Naringenina-6,8-di-C-Glucósido	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	5.02	595	-45	355 / 475 / 385
Naringenina-7-O-Rutinósido-4'-O-Glucósido	C <sub>33</sub> H <sub>42</sub> O <sub>19</sub>	5.29	741	-30	433 / 741 / 271 / 579
Hesperetina-7-Rutinósido	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	7.48	609	-30	301 / 609 / 325 / 343 / 286 / 257
<b>Flavonas</b>					
Apigenina-6,8-di-C-Glucósido	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	5.01	593	-45	353 / 383 / 473 / 503 / 365 / 297 / 413 / 455 / 323
Vitexina-2"-O-Xilósido	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	5.86	563	-45	293 / 413
Apigenina-8-C-Glucósido	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	4.48	431	-30	385 / 223
Luteolin-6,8-di-C-Glucósido	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	4.60	609	-55	369 / 399 / 489 / 519

TR, Tiempo de retención; m/z, Relación masa/carga; [M-H]<sup>-</sup>, Ion molecular cargado negativamente; EC, Energía de colisión

**Tabla 5.** Contenido ( $\mu\text{g/g}$  de producto seco y bioaccesibilidad (%IB) de compuestos fenólicos de naranja dulce (*Citrus sinensis*) antes y después de un proceso de digestión *in vitro*.

Compuestos	Sin digerir	Fase gástrica		Fase intestinal	
	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	%IB	$\mu\text{g/g}$	%IB
<b>Ácidos hidroxicinámicos</b>					
Ácido ferúlico-O-Hexósido	157.63 $\pm$ 35.38 <sup>a</sup>	79.61 $\pm$ 47.86 <sup>a,b</sup>	50	0.69 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>	0
Ácido sinápico	414.72 $\pm$ 80.74 <sup>a</sup>	208.26 $\pm$ 58.99 <sup>b</sup>	50	2.69 $\pm$ 0.21 <sup>c</sup>	1
<i>Subtotal</i>	<i>572.35</i>	<i>287.87</i>		<i>3.38</i>	
<b>Flavonoles</b>					
Quercetina-3-O-Rutinósido-7-O-Glucósido	10.90 $\pm$ 0.63 <sup>a</sup>	12.97 $\pm$ 5.71 <sup>a</sup>	119	15.82 $\pm$ 5.31 <sup>a</sup>	145
Miricetina-3-Rutinósido	40.44 $\pm$ 3.37 <sup>a</sup>	35.83 $\pm$ 12.71 <sup>a</sup>	89	26.92 $\pm$ 10.58 <sup>a</sup>	66
Isorhamnetin-7-O-Rutinósido	14.43 $\pm$ 2.08 <sup>a</sup>	13.03 $\pm$ 3.06 <sup>a</sup>	91	11.28 $\pm$ 3.53 <sup>a</sup>	78
Isorhamnetin-3-O-hexósido-7-O-ramnosilhexósido	6.06 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>	5.37 $\pm$ 2.22 <sup>a</sup>	89	5.29 $\pm$ 2.16 <sup>a</sup>	86
<i>Subtotal</i>	<i>71.83</i>	<i>67.20</i>		<i>59.31</i>	
<b>Flavanonas</b>					
Isosakuranetin-7-O-Rutinósido	428.75 $\pm$ 23.98 <sup>a</sup>	344.80 $\pm$ 30.26 <sup>b</sup>	80	325.14 $\pm$ 12.57 <sup>b</sup>	76
Naringenina-7-O-Rutinósido	647.79 $\pm$ 19.16 <sup>a</sup>	886.15 $\pm$ 29.77 <sup>b</sup>	137	630.87 $\pm$ 79.60 <sup>a</sup>	97

Los resultados son expresados como media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de un factor y Tukey como prueba *post hoc*. En cada parámetro, letras en superíndice diferentes en la misma fila indican diferencia estadística significativa ( $p<0.05$ ).

**Continuación Tabla 5.** Contenido ( $\mu\text{g/g}$  de producto seco y bioaccesibilidad (%IB) de compuestos fenólicos de naranja dulce (*Citrus sinensis*) antes y después de un proceso de digestión *in vitro*.

Compuestos	Sin digerir	Fase gástrica		Fase intestinal	
	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	%IB	$\mu\text{g/g}$	%IB
<b>Flavanonas</b>					
Naringenina-7-O-Neohesperidósido	1428.76 $\pm$ 66.12 <sup>a</sup>	870.92 $\pm$ 56.95 <sup>b</sup>	61	867.91 $\pm$ 73.41 <sup>b</sup>	61
Naringenina-6,8-di-C-Glucósido	4.08 $\pm$ 1.10 <sup>a</sup>	3.49 $\pm$ 1.40 <sup>a</sup>	85	3.75 $\pm$ 2.45 <sup>a</sup>	92
Naringenina-7-O-Rutinósido-4'-O-Glucósido	41.97 $\pm$ 6.54 <sup>a</sup>	42.36 $\pm$ 16.34 <sup>a</sup>	101	35.46 $\pm$ 11.27 <sup>a</sup>	84
Hesperetina-7-O-Rutinósido	4434.92 $\pm$ 40.80 <sup>a</sup>	3679.68 $\pm$ 38.42 <sup>b</sup>	83	3599.18 $\pm$ 70.14 <sup>b</sup>	81
<i>Subtotal</i>	6986.27	5827.40		5462.31	
<b>Flavonas</b>					
Apigenina-6,8-di-C-Glucósido	216.75 $\pm$ 7.70 <sup>a</sup>	342.25 $\pm$ 11.42 <sup>b</sup>	158	313.24 $\pm$ 16.38 <sup>b</sup>	145
Vitexina-2"-O-Xilósido	199.36 $\pm$ 3.20 <sup>a</sup>	164.88 $\pm$ 26.43 <sup>a</sup>	83	167.32 $\pm$ 30.73 <sup>a</sup>	84
Apigenina-8-C-Glucósido	16.11 $\pm$ 1.09 <sup>a</sup>	15.28 $\pm$ 5.91 <sup>a</sup>	95	15.20 $\pm$ 5.25 <sup>a</sup>	94
Luteolin-6,8-di-C-Glucósido	5.44 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	4.58 $\pm$ 1.92 <sup>a</sup>	84	2.55 $\pm$ 1.00 <sup>a</sup>	47
<i>Subtotal</i>	437.66	526.99		498.31	
<b>Total</b>	<b>8068.11</b>	<b>6709.46</b>		<b>6023.31</b>	

Los resultados son expresados como media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de un factor y Tukey como prueba *post hoc*. En cada parámetro, letras en superíndice diferentes en la misma fila indican diferencia estadística significativa ( $p<0.05$ ).

El grupo mayoritario de CF antes y después de la digestión *in vitro* fue el de flavanonas (87% y 91%, respectivamente). Por otro lado, el grupo minoritario de CF fueron los flavonoles antes de la digestión (0.9%), sin embargo, los ácidos hidroxicinámicos disminuyeron al término de la digestión (7% a 0.06%), siendo el grupo minoritario al término de la digestión *in vitro*. Además, los grupos de las flavonas y flavonoles aumentaron al término de la digestión *in vitro* (5% a 8% y 0.9 a 1%, respectivamente).

La Hesperetina-7-O-Rutinósido fue el CF encontrado en mayor concentración en la muestra sin digerir con una disminución significativa ( $p < 0.001$ ) en la fase gástrica y al finalizar la fase intestinal del proceso de digestión *in vitro*. Otros CF encontrados mayoritariamente en las muestras sin digerir, del grupo de las flavanonas, fueron la Naringenina-7-O-Neohesperidósido ( $1428.76 \pm 66.12 \mu\text{g/g}$  de producto seco) y la Naringenina-7-O-Rutinósido ( $647.79 \pm 19.16 \mu\text{g/g}$ ).

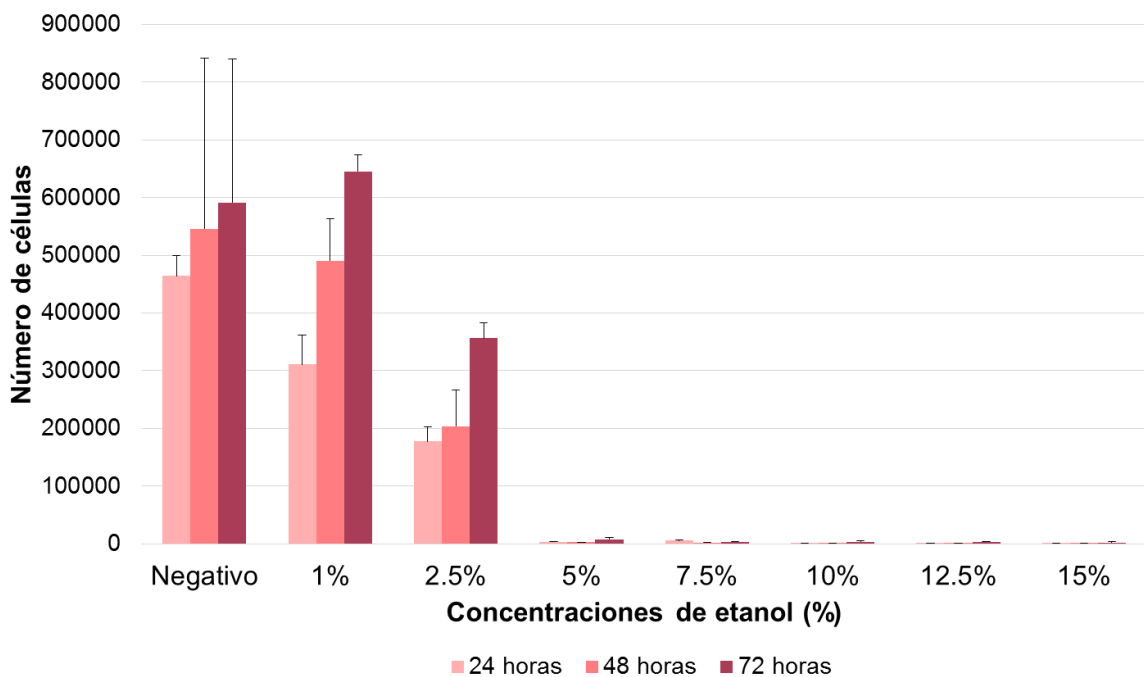
Los compuestos fenólicos minoritarios en la muestra sin digerir fueron la Luteolina-6,8-di-C-Glucósido ( $5.44 \pm 0.43 \mu\text{g/g}$  de producto seco) del grupo de las flavonas y la Isorhamnetina-3-O-hexósido-7-O-ramnosilhexósido ( $6.06 \pm 0.31 \mu\text{g/g}$  de producto seco) del grupo de los flavonoles.

Se observó una disminución significativa durante la fase gástrica del ácido sinápico ( $p < 0.05$ ), Isosakuranetin-7-O-Rutinósido ( $p < 0.05$ ), Naringenina-7-O-Neohesperidósido ( $p < 0.001$ ), Hesperetina-7-O-Rutinósido ( $p < 0.001$ ). Al terminar la digestión *in vitro*, se observó una disminución significativa entre la muestra sin digerir y la fase intestinal de los compuestos fenólicos ácido ferúlico-O-hexósido ( $p < 0.05$ ), ácido sinápico ( $p < 0.001$ ), Isosakuranetina-7-O-Rutinósido ( $p < 0.05$ ), Naringenina-7-O-Neohesperidósido ( $p < 0.001$ ) y Hesperetina-7-O-Rutinósido ( $p < 0.001$ ).

La Apigenina-6,8-di-C-Glucósido fue el CF que aumentó significativamente ( $p < 0.001$ ) después de la fase intestinal ( $216.75 \pm 7.70 \mu\text{g/g}$  a  $313.24 \pm 16.38 \mu\text{g/g}$  de producto seco). Sin embargo los CF, Quercetina-3-O-Rutinósido-7-O-Glucósido, Isorhamnetina-3-O-hexósido-7-O-ramnosilhexósido, Miricetina-3-Rutinósido, Isorhamnetina-3-O-Rutinósido, Naringenina-7-O-Rutinósido, Naringenina-6.8-di-C-Glucósido, Naringenina-7-O-Rutinósido-4'-O-Glucósido, Vitexina-2''-O-Xilósido, Apigenina-8-C-Glucósido y Luteolina-6,8-di-C-Glucósido no tuvieron cambios estadísticamente significativos entre la muestra sin digerir y la fase intestinal de la digestión *in vitro*.

**Objetivo 3. Determinar la DL<sub>50</sub> de los compuestos fenólicos bioaccesibles obtenidos por la digestión *in vitro* de *Citrus sinensis* en células 3T3-L1.**

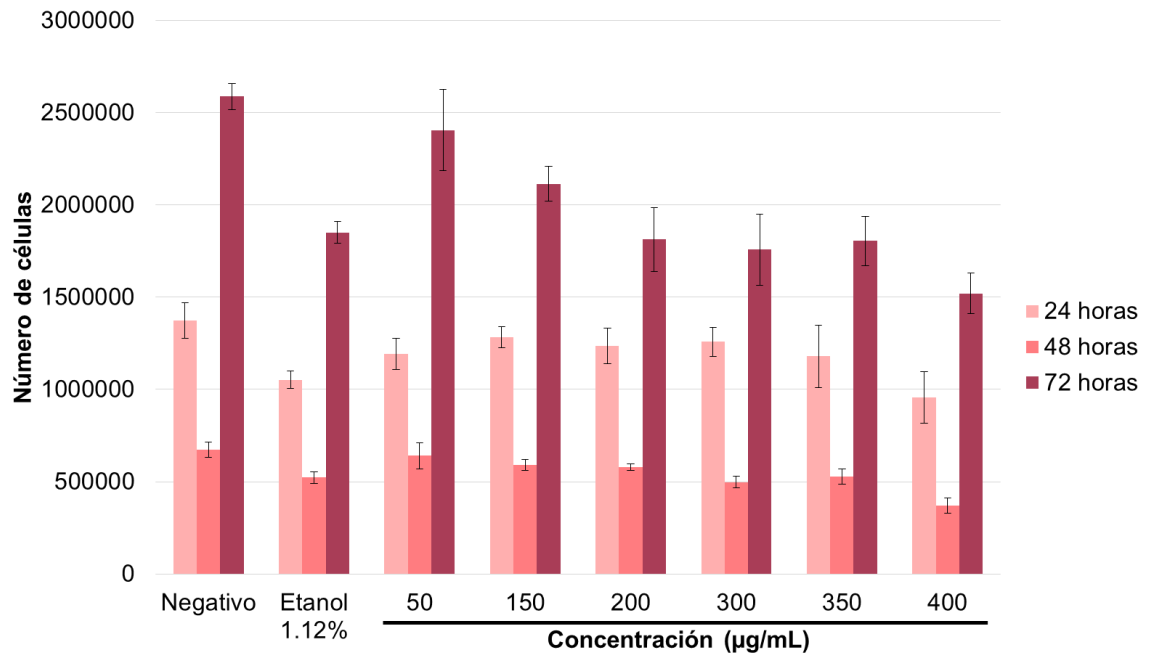
En primer lugar, se realizó la estandarización de la concentración de etanol a utilizar para el tratamiento celular sobre la viabilidad celular a las 72 horas (Figura 10).



**Figura 10.** Efecto de diferentes concentraciones de etanol (%) sobre la viabilidad de la línea celular 3T3-L1 a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento.



Se obtuvo una  $DL_{50}$  de concentración de etanol de 1% para el tratamiento celular. Posteriormente, se realizó el ensayo de viabilidad del extracto etanólico a 24, 48 y 72 horas con los CFB obtenidos de la digestión dializada de pulpa de *C. sinensis* (**Figura 11**) en células 3T3-L1.



**Figura 11.** Efecto de los compuestos bioaccesibles obtenidos de la *digestión in vitro* de naranja dulce (*Citrus sinensis*) sobre la viabilidad de la línea celular 3T3-L1 a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento.

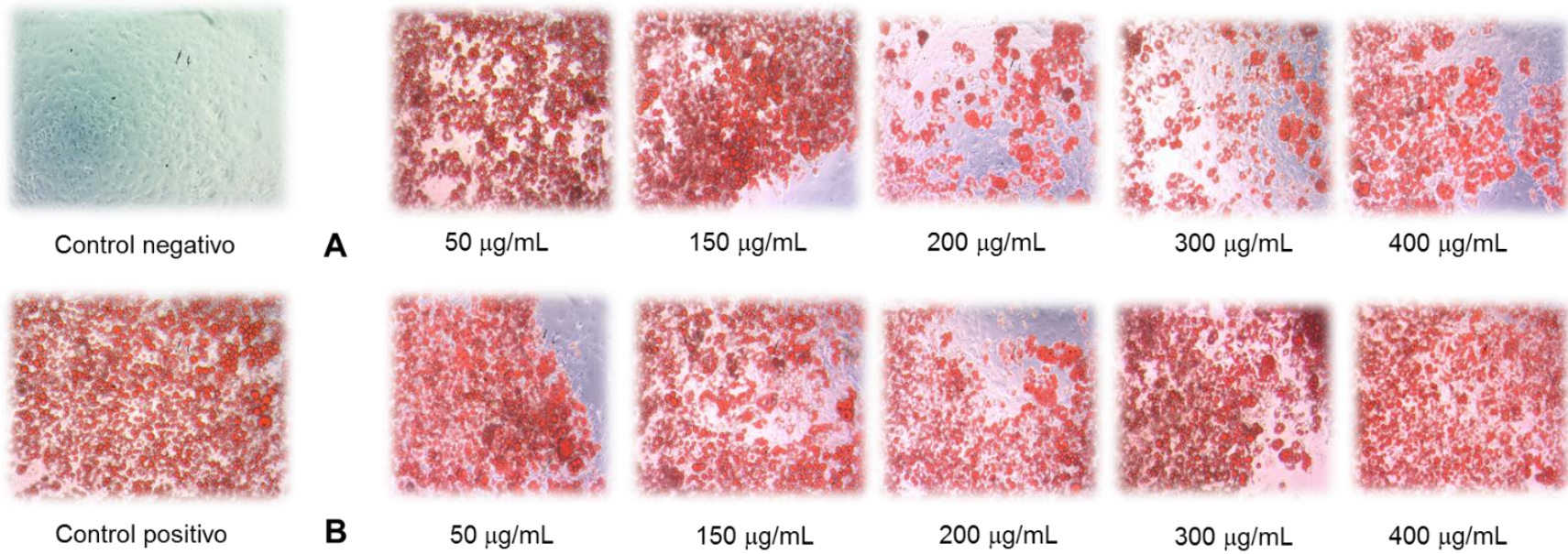
Para el tratamiento celular se obtuvo la  $DL_{50}$  a los 400 µg/mL. De esta manera, se realizó el ensayo de adipogénesis (día 0 a día 21) y lipólisis (día 12 a día 21) con las dosis de 50 a 400 µg/mL de extracto etanólico con los CFB de la naranja dulce (*C. sinensis*).

**Objetivo 4. Analizar el efecto de los compuestos fenólicos bioaccesibles obtenidos por la digestión *in vitro* de *Citrus sinensis* sobre el proceso de diferenciación adipocitaria y estimulación de la lipólisis en células 3T3-L1.**

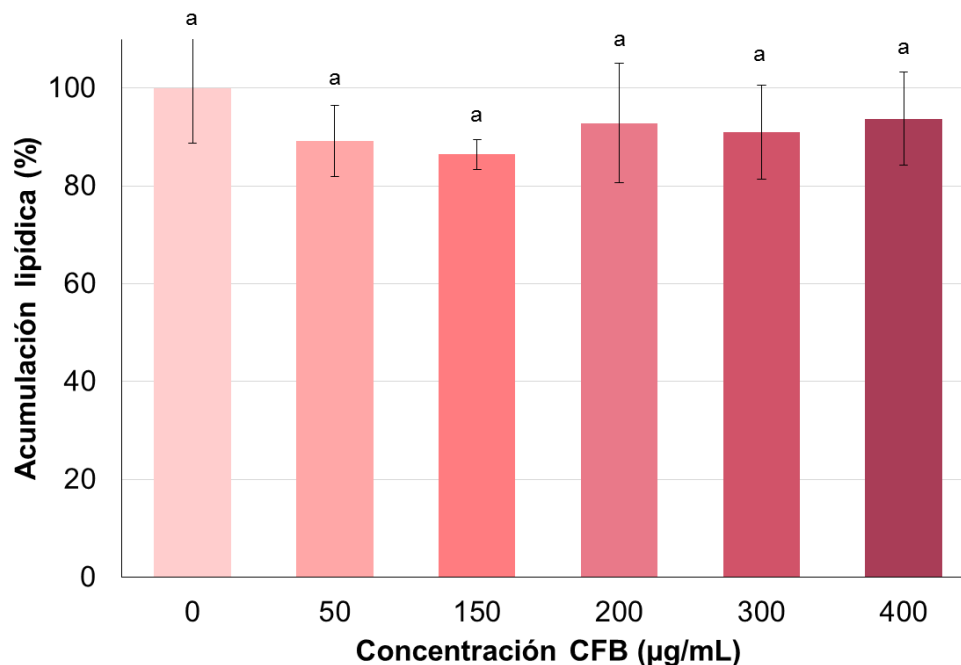
El efecto de los compuestos fenólicos bioaccesibles (CFB) de la naranja dulce (*C. sinensis*) sobre la acumulación lipídica en células 3T3-L1 se evaluó mediante el análisis de la inhibición de la diferenciación celular (adipogénesis) y la inducción de disminución del contenido lipídico intracelular (lipólisis). Por lo anterior, se realizaron los ensayos de inhibición de adipogénesis e inducción de lipólisis en placas de cultivo de 96 pocillos con controles negativos (sin diferenciación celular y sin CFB) y controles positivos (con diferenciación celular y sin CFB). Las células preadiposas fueron tratadas a diferentes dosis de CFB a partir del día 0 hasta el día 21 para la inhibición de adipogénesis. Por otro lado, células maduras de la línea 3T3-L1 fueron tratadas a partir del día 12 hasta el término del experimento (día 21) para analizar la inducción de lipólisis.

A los 21 días del ensayo, se determinó la proporción de células diferenciadas, en los controles y las células tratadas a diferentes concentraciones (50-400 µg/mL) de CFB, de manera cualitativa mediante la visualización en microscopio (**Figura 12**) y cuantitativamente por método espectrofotométrico, analizando la tinción de las células con el colorante histoquímico rojo oleoso en el proceso de inhibición de adipogénesis (**Figura 13**) y el proceso de inducción de lipólisis (**Figura 14**).

Al inducir la diferenciación celular de la línea de preadipocitos 3T3-L1 se observaron cambios morfológicos en el grupo de inhibición de adipogénesis entre el control positivo y las células tratadas con CFB a dosis de 200 y 300 µg/mL y, en el grupo de inducción de lipólisis a dosis de 200 µg/mL.



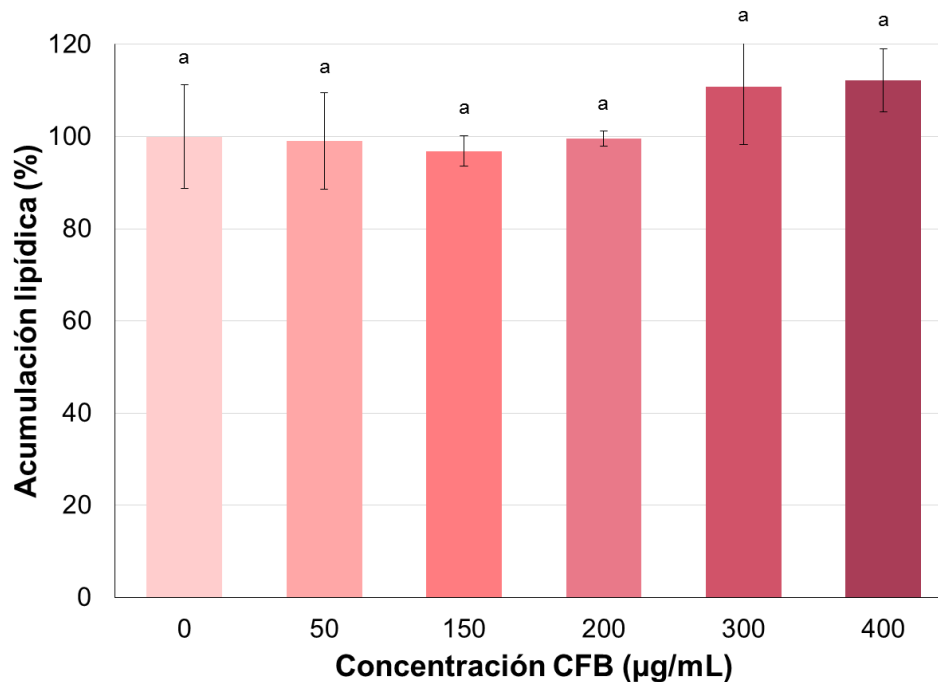
**Figura 12.** Células tratadas con compuestos fenólicos bioaccesibles (CFB) de naranja dulce (*Citrus sinensis*) obtenidos de un proceso de digestión *in vitro* y diálisis. Las células fueron teñidas con rojo oleoso al día 21. a) Tratamiento celular de células durante su diferenciación (día 0) a diferentes concentraciones (50-400 µg/mL) de extracto etanólico con CFB. b) Tratamiento celular de adipocitos maduros (día 12) a distintas concentraciones de extracto etanólico (50-400 µg/mL) de CFB. Las fotografías corresponden a un experimento representativo para cada dosis. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio óptico (Carl Zeiss) a 10X.



**Figura 13.** Efecto sobre la acumulación lipídica en células 3T3-L1 tratadas con compuestos fenólicos bioaccesibles (CFB) de naranja dulce (*Citrus sinensis*) desde el inicio del ensayo hasta el día 21 (adipogénesis). Los resultados son expresados como porcentaje de la acumulación lipídica respecto al control positivo (0 µg/mL) de células diferenciadas (100%). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de un factor y Tukey como prueba *post hoc* (n=3). Letras en superíndice diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

A los 21 días del ensayo, haciendo uso de técnicas espectroscópicas, se analizaron las células tratadas desde el inicio (día 0) hasta el final del experimento (día 21) (**Figura 13**) para observar el efecto en el proceso de adipogénesis en la línea 3T3-L1, sin embargo, no se encontró una disminución significativa en el contenido lipídico.

Se observó una disminución, no significativa, del 14% en la acumulación lipídica de células tratadas a dosis de 150 µg/mL, similar a lo observado cualitativamente en el microscopio óptico (**Figura 12**).



**Figura 14.** Efecto sobre la acumulación lipídica en células 3T3-L1 tratadas con compuestos fenólicos bioaccesibles (CFB) de naranja dulce (*Citrus sinensis*) desde el día 12 del ensayo hasta el día 21 (lipólisis). Los resultados son expresados como porcentaje de la acumulación lipídica respecto al control positivo (0 µg/mL) de células diferenciadas (100%). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de un factor y Tukey como prueba *post hoc* (n=3). Letras en superíndice diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

En el porcentaje de acumulación lipídica en las células tratadas durante 10 días (día 12 a 21) para evaluar el mecanismo de lipólisis no se encontró una disminución en las distintas concentraciones de extracto etanólico con los CFB (**Figura 14**), similar a lo observado en el microscopio óptico (**Figura 12**).

## XI. DISCUSIÓN

Los procesos digestivos *in vitro* se han desarrollado para la simulación de condiciones fisiológicas del cuerpo humano, los cuales pueden incluir los procesos de la boca, estómago e intestino (De Santiago *et al.*, 2018). Se han reportado en distintas matrices alimentarias el comportamiento de los compuestos fenólicos propios del alimento, sin embargo, en México no se han realizado estudios sobre el comportamiento de matrices cítricas cosechadas en la región, así como su efecto en procesos implicados en el desarrollo de obesidad, como la adipogénesis y lipólisis.

**Objetivo 1. Evaluar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos de *Citrus sinensis* a través de una digestión *in vitro*.**

La técnica de Folin-Ciocalteu es utilizada para la cuantificación de compuestos fenólicos totales (CFT), siendo un método útil y rápido (Musci, y Yao, 2017). El perfil de CFT se ve influenciado por factores externos en la cosecha como, el ambiente, la temperatura, riego y condiciones del agua, así como la exposición a la luz y el suelo (Lu, Lv, Peng, Zhu, y Pan, 2018; Gironés-Vilaplana, Moreno, y García, 2014; Iglesias-Carres, Mas-Capdevila, Bravo, Aragonès, Muguerra, y Arola-Arnal, 2019). Lo anterior, se ha observado en la naranja dulce (*C. sinensis*), reportando concentraciones de CFT distintos según la variedad, la región y el proceso digestivo aplicado, encontrando contenidos similares de CFT en la naranja dulce sin digerir variedad Navel (652 mg EAG/100 g de producto seco) (Lu *et al.*, 2018).

En estudios recientes con limón (*Citrus limon* Burm.), se observaron variaciones entre los cultivos pero también se analizaron las distintas partes del limón sin digerir, la cáscara, pulpa, jugo, semillas y la fruta completa, encontrando un mayor contenido de CFT en la cáscara (3.17 a 4.63 mg EAG / g de producto fresco), seguido de la pulpa (2.43 a 3.46 mg EAG / g de producto fresco), las

semillas (2.12 a 3.36 mg EAG / g de producto fresco), y, el menor contenido de CFT fue reportado en el jugo de limón (0.29 a 0.52 mg EAG / g de producto fresco) (Xi, Lu, Qun, y Jiao, 2017). Por lo tanto, existen otros factores como la composición de la matriz alimentaria y la fracción analizada que influyen en la obtención y cuantificación de los CFT.

Lucas-González *et al.* (2016), reportaron la bioaccesibilidad de los CFT al finalizar la fase oral (79.79%), gástrica (112.92%) e intestinal después de un proceso de diálisis (21.76%) en un cultivo de zarzamora chilena (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz). Lo anterior es explicado por la influencia de factores internos en el proceso digestivo, como el pH (ácido a alcalino) (Rodríguez-Roque, Rojas-Graü, Elez-Martínez, y Martín-Belloso, 2013) y la temperatura; así como, la interacción con otros componentes dietéticos (hidratos de carbono, proteínas y minerales) y la presencia de distintas enzimas, que influyen en la extracción y recuperación de compuestos fenólicos bioaccesibles (CFB) (Rein, Renouf, Cruz-Hernández, Actis-Goretta, Thakkar, y Da Silva Pinto, 2013; Bouayed *et al.*, 2011).

Cilla *et al.* (2011), reportaron en un jugo de frutas que contenía naranja, albaricoque y uva con o sin leche desnatada, una disminución en el porcentaje de CFB desde 4.1 a 26.7% en los distintos jugos. En ese sentido, la disminución de los CFB fue menor a la obtenida en este estudio (25%) al terminar la fase intestinal, lo cual puede ser explicado por los métodos distintos de digestión *in vitro*, al utilizar distintas concentraciones de enzimas, tiempo de incubación y condiciones en la temperatura del método elegido.

## **Objetivo 2. Identificar y cuantificar los compuestos fenólicos de *Citrus sinensis* durante un proceso de digestión *in vitro* por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS)**

El uso de HPLC se ha convertido en una técnica robusta para el análisis eficaz de compuestos bioactivos como compuestos fenólicos (CF) y, en conjunto con la espectrometría de masas, se convierte en un instrumento para caracterizar estructuralmente los componentes de una muestra (Kumar, 2017).

La bioaccesibilidad de los CF obtenidos al finalizar la fase intestinal (75%) por HPLC-ESI-MS/MS coincide con lo obtenido por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Sin embargo, en la digestión gástrica existe una diferencia mayor en el porcentaje de bioaccesibilidad por el método de Folin-Ciocalteu del 13%. Esta comparación entre HPLC-ESI-MS/MS y el método de Folin-Ciocalteu fue reportada sobre la bioaccesibilidad de CF en té verde (*Camellia sinensis*) identificando el mismo comportamiento en la cuantificación al realizar la comparación (Annunziata, Maisto, Schisano, Ciampaglia, Daliu, y Narciso *et al.*, 2018).

Los CF encontrados en mayores cantidades en matrices cítricas (Naranja dulce variedad Navel) sin digerir son la Hesperetina-7-O-Rutinósido y Naringenina-7-O-Rutinósido (Abad-García *et al.*, 2012). Lo anterior, es similar a lo obtenido en la muestra, sin embargo, algunos CF pueden no ser identificados o encontrarse en concentraciones menores debido al tipo de muestra utilizada, la variedad y región en la que fue cultivada (Lu *et al.*, 2018).

Otros CF encontrados en la pulpa de *C. sinensis* antes y después del proceso digestivo fueron similares a los encontrados en matrices cítricas (naranjas dulces y amargas), como Vicenin-2 (Apigenina-6,8-di-C-Glucósido, Naringenina-7-O-Rutinósido-4'-O-Glucósido, Naringenina-7-O-Rutinósido, Hesperetina-7-O-Rutinósido y Dydimin (Isosakuranetina-7-O-Rutinósido) (De



Ancos *et al.*, 2017; Pereira-Cano, Ludwig, Polyviou, Malkova, García, y Moreno-Rojas *et al.*, 2016). También, se han identificado al ácido ferúlico-*O*-hexósido y ácido sinápico en naranja dulce de variedad Navel, una mutante espontánea de la variedad Navel (Cara-Cara) y en mandarina (*Citrus clementina* L.) en muestras sin digerir, sin embargo, no fueron cuantificados al finalizar el proceso digestivo (De Ancos *et al.*, 2017). Por otro lado, el ácido ferúlico identificado en nopales (*Opuntia ficus indica*) tuvo un comportamiento similar al disminuir durante la fase intestinal (De Santiago *et al.*, 2018).

En jugos de naranja dulce (*C. sinensis* L. Osbeck) sin digerir, se ha reportado al subgrupo de las flavanonas como el mayoritario, siendo la hesperetina-7-*O*-rutinósido el componente más abundante, seguido de la naringenina-7-*O*-rutinósido, así como en el grupo de las flavonas, el componente mayoritario fue la apigenina-6,8-di-*C*-glucósido (Barreca, Bellocco, Leuzzi, y Gattuso, 2014), similar a los compuestos identificados en la muestra sin digerir en este estudio.

La disminución o aumento de los distintos CF identificados se explican por distintos factores. Se han observado en distintas matrices cítricas cómo la adición de sales biliares ayuda en la liberación de CF hasta 5 veces más en comparación a métodos que no las contemplan (Yang, Jayaprakasha, y Patil, 2018; Sahidi, y Peng, 2018) Además, la variación de pH y enzimas son los principales factores que contribuyen a la disminución o aumento en la liberación de CF (Chen, Chen, Xie, Chen, Zhao, y Luo *et al.*, 2015). Por lo tanto, el pH y la actividad enzimática afectan los procesos digestivos, ya que no sólo se encargarán de la ruptura de enlaces y matrices alimentarias, sino también ayudarán a la liberación de CF (Sahidi *et al.*, 2018).

El análisis antes de la digestión *in vitro* y en las fases gástrica e intestinal de este estudio, no contemplan la fase II del metabolismo, donde los CF son metabolizados, obteniendo catabolitos importantes que llegarán a las distintas

células, tejidos y órganos para producir un efecto o bioactividad. Por lo anterior, esta investigación es un acercamiento a un proceso digestivo *in vivo*, sin embargo, es importante el análisis de catabolitos por fermentación colónica para evaluar los cambios estructurales de los CF al ser metabolizados, que llegarán a los distintos tejidos para producir un efecto metabólico, lo cual permitiría la aproximación a lo que ocurre en modelos *in vivo*.

**Objetivo 3. Determinar la DL<sub>50</sub> de los compuestos fenólicos bioaccesibles obtenidos por la digestión *in vitro* de *Citrus sinensis*.**

Se ha reportado que de 0.30 a 1.75% de etanol en el tratamiento celular en líneas de 3T3-L1 no se presenta toxicidad celular (Yeo, Lim, y Park, 2000), comparable a este estudio obteniendo una DL<sub>50</sub> de 1% de etanol para el tratamiento celular con los CFB.

Raciti *et al.* (2018), reportaron una disminución del 10% de la viabilidad celular en la línea 3T3-L1 tratada durante 24 horas con extractos metanólicos de jugo de naranja amarga (*Citrus aurantium* L.) a concentraciones de 1000 µg/mL. Así mismo, Park *et al.* (2014), reportan una viabilidad mayor al 75% a dosis de 1 a 50 µg/mL con extractos etanólicos de pulpa de *C. aurantium* a 24 horas en células humanas de cáncer de hígado (HepG2). Los datos reportados por Park *et al.* (2014) coinciden con los datos obtenidos en este estudio a las 24 horas obteniendo una viabilidad celular de 70% o mayor, sin embargo, se analizó el efecto a 72 horas, observando una viabilidad de 59% o mayor. Lo anterior destaca como el uso de distintos solventes para el tratamiento celular puede influir no sólo en la extracción de CF, sino también en el efecto sobre la viabilidad celular.

En estudios recientes por Chen *et al.* (2017), se reportó el efecto en la viabilidad de extractos etanólicos de moras en células HepG2, en el cual no se observó una disminución con el ensayo MTT a concentraciones de 0.5, 1 y 2

mg/mL del extracto en comparación al control. En el presente estudio se utilizaron concentraciones menores a 500 µg/mL para el tratamiento celular, observando una disminución en la viabilidad celular a partir de la dosis menor (50 µg/mL). De este modo, estos estudios difieren en la matriz alimentaria, la línea celular utilizada, el tiempo y el método para la determinación de la DL<sub>50</sub>.

Los CF son encontrados en cantidades mayores en la cáscara de la matriz alimentaria (Xi *et al.*, 2017). Así mismo, para el estudio sobre el tratamiento de compuestos fenólicos biodisponibles de matrices cítricas en modelos celulares, el término bioconversión, ha adquirido gran importancia para el estudio de la biodisponibilidad *in vitro* de CF, tomando en cuenta su estructura como glucósidos en la matriz alimentaria y su cambio estructural para ser absorbidos (Santino, Scarano, de Santis, de Benedictis, Giovinazzo, y Chieppa, 2017). Lim *et al.* (2015) en un estudio de bioconversión con extractos de cáscara de mandarina (*Citrus unshiu*) sobre la viabilidad celular y el efecto en la actividad adipogénica en células 3T3-L1, no observaron efectos inhibitorios en la viabilidad celular a la concentración mayor (0.5 mg/mL). A pesar de tomar en cuenta la fracción con mayor contenido de CF y la conversión de glucósidos hacia agliconas, es necesario analizar la parte fisiológica en los procesos digestivos para tener un mayor acercamiento a lo que ocurre en modelos *in vivo*.

Es importante destacar, que se ha contemplado el proceso de diálisis para simular la difusión pasiva de los CF en el intestino delgado para, posteriormente realizar el tratamiento celular en la línea 3T3-L1, lo cual es un acercamiento a los procesos de absorción en modelos *in vivo*. Sin embargo, se debe considerar el análisis de los catabolitos formados por la fermentación colónica, así como, considerar la fase del metabolismo II en hígado. La formación de catabolitos puede influir en el efecto que tendrán dichos CF y de esta manera, tener un mayor acercamiento a los procesos digestivos y de absorción de modelos *in vivo*.

**Objetivo 4. Analizar el efecto de los compuestos fenólicos bioaccesibles obtenidos por la digestión *in vitro* de *Citrus sinensis* sobre el proceso de diferenciación adipocitaria y estimulación de la lipólisis en células 3T3-L1.**

La obesidad es el resultado de un desbalance energético, que da lugar a un incremento en la acumulación lipídica en el tejido adiposo, presentando hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos (Torres-Villarreal *et al.*, 2018). La línea celular utilizada para el estudio de la diferenciación adipocitaria y la maduración de los adipocitos fue la línea 3T3-L1, la cual ha sido empleada en numerosos estudios *in vitro* para el análisis de mecanismos implicados en el metabolismo lipídico, adipogénesis y lipólisis, así como, el efecto del tratamiento con distintos compuestos fenólicos (CF) (Eseberri, Miranda, Lasa, Churruca, y Portillo, 2015; Kim *et al.*, 2012).

Los estudios realizados en la línea celular 3T3-L1 con CF, se basan en el uso de componentes aislados o extractos naturales, para el análisis del efecto sobre los mecanismos del metabolismo lipídico y su papel en el desarrollo de la obesidad (Mosqueda-Solís, Lasa, Gómez-Zorita, Eseberri, Picó, y Portillo, 2017; Kim *et al.*, 2012; Torres-Villarreal *et al.*, 2018). Se han identificado efectos antiadipogénicos en células adiposas tratadas con extractos naturales de matrices cítricas como la naranja amarga (*Citrus aurantium* L.) al promover la expresión de genes como C/EBP $\beta$  (Raciti *et al.*, 2018). Así mismo, estudios con CF aislados, como naringenina, han reportado la inhibición de adipogénesis en la línea celular 3T3-L1 a concentraciones elevadas (183  $\mu$ M) durante 7 días (Richard, Amini-Vaughan, Ribnicky, y Stephens, 2013). Sin embargo, estos estudios no consideran las condiciones fisiológicas, la pérdida de los CF y cambios estructurales durante el proceso digestivo.

Harmon *et al.* (2001), reportaron como el tratamiento celular con CF aislados, como la naringenina (100  $\mu$ M) durante 7 días, no tuvo efecto sobre la inhibición de la adipogénesis. En un estudio reciente, se utilizaron 120  $\mu$ M de

naringenina (una flavanona en forma de aglicona) durante 21 días, sin embargo, no se observaron efectos sobre la acumulación lipídica en las células tratadas (datos no publicados). Las diferencias encontradas entre los estudios pueden ser atribuidos a los factores como las condiciones en las que fueron evaluados, la concentración de los CF, el tiempo de tratamiento celular, y el tipo de CF evaluados, ya sea aislados, extractos o digestiones.

En la digestión de CF, como los flavonoides, son ingeridos en su forma de glucósidos y, sólo algunos, son absorbidos por el intestino delgado, en donde pierden su glucósido y obteniendo catabolitos que realizarán su actividad biológica, la cual difiere de la que presentan al inicio de la digestión (Rodríguez-Mateos *et al.*, 2014; Thilakarathna *et al.*, 2013).

Estudios recientes sobre la bioconversión de CF en extractos de *C. unshiu* para el tratamiento en células 3T3-L1, reportaron un papel en la inhibición de adipogénesis a dosis de 0.5 mg/mL (Lim *et al.*, 2015). Sin embargo, es necesario contemplar los procesos fisiológicos que afectan en la pérdida de CF antes de ser absorbidos. Por lo anterior, se diseñó este estudio, contemplando no sólo la simulación de un proceso digestivo, sino también, la difusión pasiva de los CF en el intestino delgado para realizar el tratamiento con los compuestos fenólicos bioaccesibles (CFB) en células 3T3-L1. De esta manera, no se utilizaron CF aislados o extractos naturales, los cuales a pesar de los resultados obtenidos en otros estudios sobre mecanismos de diferenciación adipocitaria, se alejan de la situación fisiológica por la cual son sometidos en la digestión gastrointestinal.

En el estudio sobre la bioaccesibilidad de los CFT obtenidos de naranja dulce (*Citrus sinensis*) se obtuvo una disminución del 25% después del proceso digestivo. De este modo, al simular la difusión pasiva de los CFB, al analizar los efectos en adipogénesis y lipólisis no se observó una disminución estadísticamente significativa. A pesar de la simulación de los procesos fisiológicos que ocurren en la digestión gastrointestinal, existen factores

limitantes que no fueron considerados en este estudio, como la fermentación colónica, ya que, al no ser absorbidos, algunos CF pasan al colon para ser metabolizados por las bacterias, para ser transportados hacia la circulación sanguínea (Thilakarathna *et al.*, 2013). Sin embargo, no existen estudios similares desarrollados. Por lo anterior, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que después del proceso digestivo, la disminución de los CFT (25%) influye directamente en la bioactividad en células adiposas 3T3-L1 sobre los mecanismos metabólicos implicados en el desarrollo de obesidad.

## XII. CONCLUSIONES

El presente estudio aporta la evaluación de la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos y su efecto en mecanismos implicados en el metabolismo lipídico. Así mismo, es un punto de partida para investigaciones futuras orientadas en la práctica clínica. De esta manera, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

1. La bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos (CF) de *C. sinensis* se redujo un 25% después de la fase intestinal del proceso de digestión *in vitro*.
2. Las flavanonas son el subgrupo de CF más abundante en la *C. sinensis* antes y después de la digestión *in vitro*.
3. La DL<sub>50</sub> se encontró a una concentración máxima de 400 µg/mL de compuestos fenólicos bioaccesibles (CFB) para el tratamiento celular.
4. El tratamiento con CFB en células 3T3-L1 no tuvo efecto sobre la inhibición de adipogénesis o sobre la estimulación de la lipólisis.
5. El contenido de CF de la naranja dulce (*C. sinensis*) depende de factores ambientales y su bioaccesibilidad disminuye después de un proceso de digestión *in vitro*.

## REFERENCIAS

- Abad-García, B., Garmón-Lobato, S., Berrueta, L. A., Gallo, B., y Vicente, F. (2012). On line characterization of 58 phenolic compounds in Citrus fruit juices from Spanish cultivars by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection coupled to electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. *Talanta*, 99(15), 213-224. doi: 10.1016/j.talanta.2012.05.042.
- Agrawal, Y. O., Sharma, P. K., Shrivastava, B., Ojha, S., Upadhyay, H. M., y Arya, D. S. *et al.* (2014). Hesperidin produces cardioprotective activity via PPAR- $\gamma$  pathway in ischemic heart disease model in diabetic rats. *PLoS ONE*, 9(11), e1111212. doi: 10.1371/journal.pone.01111212.
- Alam, M. A., Subhan, N., Rahman, M. M., Uddin, S. J., Reza, H. M., y Sarker, S. D. (2014). Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. *Advances in Nutrition*, 5(4), 404-417. doi: 10.3945/an.113.005603.
- Annunziata, G., Maisto, M., Schisano, C., Ciampaglia, R., Daliu, P., y Narciso, V. *et al.* (2018). Colon bioaccessibility and antioxidant activity of white, green and black tea polyphenols extract after *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. *Nutrients*, 10(11), 1-17. doi: 10.3390/nu10111711.
- Aschoff, J. K., Kaufmann, S., Kalkan, O., Neidhart, S., Carle, R., y Schweiggert, R. M. (2015). *In vitro* bioaccessibility of carotenoids, flavonoids, and vitamin C from differently processed oranges and orange juices [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 578-587. doi: 10.1021/jf505297t.



- Barreca, D., Bellocco, E., Leuzzi, U., y Gattuso, G. (2014). First evidence of C- and O-glycosyl flavone in blood orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) juice and their influence on antioxidant properties. *Food Chemistry*, *149*, 244-252. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.10.096.
- Bouayed, J., Hoffmann, L., y Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastrointestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, *128*(1), 14-21. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.02.052.
- Bredsdorff, L., Nielsen, I. L. F., Rasmussen, S. E., Cornett, C., Barron, D., y Bouisset, F. *et al.* (2010). Absorption, conjugation and excretion of the flavanones, naringenin and hesperetin from-rhamnosidase-treated orange juice in human subjects. *British Journal of Nutrition*, *103*(11), 1602-1609. <https://doi.org/10.1017/S0007114509993679>.
- Chen, G-L., Chen, S-G., Xie, Y-Q., Chen, F., Zhao, Y-Y., y Luo, C-X. *et al.* (2015). Total phenolic, flavonoid and antioxidant activity of 23 edible flowers subjected to *in vitro* digestion. *Journal of Functional Foods*, *17*, 243-259. doi: 10.1016/j.jff.2015.05.028.
- Chen, W., Li, Y., Bao, T., y Gowd, V. (2017). Mulberry fruit extract affords protection against ethyl carbamate-induced cytotoxicity and oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, ID 1594963. doi: 10.1155/2017/1594963.
- Christodoulides, C., Lagathu, C., Sethi, J., y Vidal, A. (2009). Adipogenesis and WNT signalling. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *20*(1), 16–24. doi: 10.1016/j.tem.2008.09.002.Adipogenesis.

- Cilla, A., Perales, S., Lagarda, M. J., Barberá, R., Clemente, G., y Farré, R. (2011). Influence of storage and *in vitro* gastrointestinal digestion on total antioxidant capacity of fruit beverages. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 87-94. doi: 10.1016/j.jfca.2010.03.029.
- Colalto, C. (2018). What phytotherapy needs: Evidence-based guidelines for better clinical practice. *Phytotherapy Research*, 32(3). doi: 10.1002/ptr.5977.
- Colker, C. M., Kalman, D. S., Torina, G. C., Perlis, T., y Street, C. (1999). Effects of *Citrus aurantium* extract, caffeine, and St. John's Wort on body fat loss, lipid levels, and mood states in overweight healthy adults. *Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental*, 60(3), 145-153. doi: 10.1016/S0011-393X(00)88523-9
- Crouch, S. P. M., Kozlowski, R., Slater, K. J., y Fletcher, J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, 160(1), 81-88. doi: 10.1016/0022-1759(93)90011-U.
- De Ancos, B., Cilla, A., Barberá, R., Sánchez-Moreno, C., y Cano, M. P. (2017). Influence of orange cultivar and mandarin postharvest storage on polyphenols, ascorbic acid and antioxidant activity during gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 225, 114-124. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.12.098.
- De la Garza, A. L., Milagro, F. I., Boque, N., Campión, J., y Martínez, J. A. (2011). Natural inhibitors of pancreatic lipase as new players in obesity treatment. *Planta Medica*, 77(8), 773–785. doi: 10.1055/s-0030-1270924.
- De Santiago, E., Gill, C. I. R., Carafa, I., Tuohy, K. M., De Peña, M. P., y Cid, C. (2019). Digestion and colonic fermentation of raw and cooked *Opuntia ficus-*

*indica* cladodes impacts bioaccessibility and bioactivity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(9), 2490-2499. doi: 10.1021/acs.jafc.8b06480.

De Santiago, E., Pereira-Caro, G., Moreno-Rojas, J. M., Cid, C., y De Peña, M. P. (2018). Digestibility of (poly)phenols and antioxidant activity in raw and cooked cactus cladodes (*Opuntia ficus-indica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 5832-5844. doi: 10.1021/acs.jafc.8b01167.

Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., y Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), 1818-1892. doi: 10.1089/ars.2012.4581.

Deng, Y., y Scherer, P. E. (2010). Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1212, E1-E19. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05875.x.

Dinnella, C., Minichino, P., D'Andrea, A. M., y Monteleone, E. (2007). Bioaccessibility and antioxidant activity stability of phenolic compounds from extra-virgin olive oils during *in vitro* digestion, 55(21), 8423-8429. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. doi: 10.1021/jf072244+.

Duarte, J., y Pérez-Vizcaíno, F. (2015). Protección cardiovascular con flavonoides. Enigma farmacocinético. *Ars Pharmaceutica*, 56(4), 193-200.

Dulloo, A. G. (2011). The search for compounds that stimulate thermogenesis in obesity management: From pharmaceuticals to functional food ingredients. *Obesity Reviews* 12(10), 866-8683. doi: 10.1111/j.1467-789X.2011.00909.x.

Eseberri, I., Miranda, J., Lasa, A., Churruga, I., y Portillo, M. P. (2015). Doses of quercetin in the range of serum concentrations exert delipidating effects in 3T3-L1 preadipocytes by acting on different stages of adipogenesis , but not in mature adipocytes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, ID 480943. doi: 10.1155/2015/480943.

Esteve, M. (2014). Tejido adiposo: Heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinología y Nutrición*, 61(2). 100-112. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2013.03.011>.

FAO. (2017). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Citrus fruit. Fresh and processed- Statistical Bulletin 2016. *Trade and Markets Division*. Roma. Obtenido el 16 de Julio de 2019 de:[http:// www.fao.org/3/a-i8092e.pdf](http://www.fao.org/3/a-i8092e.pdf).

Favela-Hernández, J. M. J., González-Santiago, O., Ramírez-Cabrera, M. A., Esquivel-Ferriño, P. C., y Camacho-Corona, M. D. R. (2016). Chemistry and pharmacology of *Citrus sinensis*. *Molecules*, 21(2), 247. doi: 10.3390/molecules21020247.

Food and Drug Administration (FDA). Code of Federal Regulations. Bioavailability and bioequivalence requirements. (2012), Obtenido el 13 de noviembre del 2017, de:<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=320.1&SearchTerm=bioavailability>.

Fruh, S. M. (2017). Obesity: Risk factors, complications, and strategies for sustainable long-term weight management. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners*, 29(S1), S3-S14. doi: 10.1002/2327-6924.12510.

- Gironés-Vilaplana, A., Moreno, D. A., y García-Viguera, C. (2014). Phytochemistry and biological activity of Spanish Citrus fruits. *Food & Function*, 5(4), 764-772. doi: 10.1039/c3fo60700c.
- Golden, A. (2017). Current pharmacotherapies for obesity: A practical perspective. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners*, 29(S1), S43-S52. doi: 10.1002/2327-6924.12519.
- Gómez-Hernández, A., Beneit, N., Díaz-Castroverde, S., y Escribano, O. (2016). Differential Role of adipose tissues in obesity and related metabolic and vascular complications. *International Journal of Endocrinology*, ID 1216783. doi: 10.1155/2016/1216783.
- Gómez-Zorita, S., Lasa, A., Abendaño, N., Fernández-Quintela, A., Mosqueda-Solís, A., y Garcia-Sobreviela, M. P. *et al.* (2017). Phenolic compounds apigenin, hesperidin and kaempferol reduce *in vitro* lipid accumulation in human adipocytes. *Journal of Translational Medicine*, 15(237), 1-10. doi: 10.1186/s12967-017-1343-0.
- Hajiaghaalipour, F., Khalilpourfarshbafi, M., Arya, A., y Arya, A. (2015). Modulation of glucose transporter protein by dietary flavonoids in type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Biological Sciences*, 11(5), 508-524. doi: 10.7150/ijbs.11241.
- Hamao, M., Matsuda, H., Nakamura, S., Nakashima, S., Semura, S., y Maekubo, S. *et al.* (2011). Anti-obesity effects of the methanolic extract and chakasaponins from the flower buds of *Camellia sinensis* in mice. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 19(20), 6033-6041. doi: 10.1016/j.bmc.2011.08.042.

- Hardy, O. T., Czech, M. P., y Corvera, S. (2012). What causes the insulin resistance underlying obesity? *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 19(2), 81–87. doi: 10.1097/MED.0b013e3283514e13.
- Harmon, A. W., y Harp, J. B. (2001). Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 280(4), C807–C813. doi: 10.1152/ajpcell.2001.280.4.C807.
- Hossain, M. K., Dayem, A. A., Han, J., Yin, Y., Kim, K., y Saha, S. K. *et al.* (2016). Molecular mechanisms of the anti-obesity and anti-diabetic properties of flavonoids. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(569), 1-32. doi: 10.3390/ijms17040569.
- Hou, F., Hu, K., Gong, Y., Xu, J., Wu, Y., y Zhang, M. (2018). Effects of *in vitro* simulated digestion on the flavonoid content and antioxidant activity of aged and fresh dried tangerine peel. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(3), 1-9. doi: 10.1111/jfpp.13532.
- Hu, Y. J., Belaghzal, H., Hsiao, W. Y., Qi, J., Bradner, J. E., y Guertin, D. A. *et al.* (2015). Transcriptional and post-transcriptional control of adipocyte differentiation by Jumonji domain-containing protein 6. *Nucleic Acids Research*, 43(16), 7790-7804. doi: 10.1093/nar/gkv645.
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., y McClements, D. J. (2011). *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1), 1-12. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.08.036.
- Iglesias-Carres, L., Mas-Capdevila, A., Bravo, F., Aragonès, G., Muguerza, B., y Arola-Arnal, A. (2019). Optimization of a polyphenol extraction method for sweet orange pulp (*Citrus sinensis* L.) to identify phenolic compounds consumed from sweet oranges. *PLoS ONE*, 14(1), 1-17. doi:

10.1371/journal.pone.0211267.

- Ikeda, K., MARETICH, P., y Kajimura, S. (2018). The common and distinct features of brown and beige adipocytes. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 29(3), 191-200. doi: 10.1016/j.tem.2018.01.001.
- Juániz, I., Ludwig, I. A., Bresciani, L., Dall'Asta, M., Mena, P., y Del Rio, D. *et al.* (2017). Bioaccessibility of (poly)phenolic compounds of raw and cooked cardoon (*Cynara cardunculus* L.) after simulated gastrointestinal digestion and fermentation by human colonic microbiota. *Journal of Functional Foods*, 32, 195-207. doi: 10.1016/j.jff.2017.02.033.
- Kim, G. S., Park, H. J., Woo, J. H., Kim, M. K., Koh, P. O., y Min, W., *et al.* (2012). *Citrus aurantium* flavonoids inhibit adipogenesis through the Akt signaling pathway in 3T3-L1 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12(31), 1-10. doi: 10.1186/1472-6882-12-31.
- Kumar, B. K. (2017). Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7(6), 349-364. doi: 10.1016/j.jpha.2017.06.005.
- Lafontan, M. (2012). Historical perspectives in fat cell biology: the fat cell as a model for the investigation of hormonal and metabolic pathways. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 302(2), C327-C359. doi: 10.1152/ajpcell.00168.2011.
- Lim, H., Yeo, E., Song, E., Chang, Y-H., Han, B-K., y Choi, H-J. *et al.* (2015). Bioconversion of *Citrus unshiu* peel extracts with cytolase suppresses adipogenic activity in 3T3-L1 cells. *Nutrition Research and Practice*, 9(6), 599-602. doi: 10.4162/nrp.2015.9.6.599.

- Lu, Q., Lv, S., Peng, Y., Zhu, C., y Pan, S. (2018). Characterization of phenolics and antioxidant abilities of red navel orange "Cara Cara" harvested from five regions of china. *International Journal of Food Properties*, 21, 1107-1116. doi: 10.1080/10942912.2018.1485030.
- Lucas-González, R., Navarro-Coves, S., Pérez-Álvarez, J., Fernández-López, J., Muñoz, L. A., y Viuda-Martos, M. (2016). Assessment of polyphenolic profile stability and changes in the antioxidant potential of maqui berry (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz) during *in vitro* gastrointestinal digestion. *Industrial Crops and Products*, 30, 774-782. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.09.057.
- Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J. A., y Fernández-López, J. (2018). *In vitro* digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. *Food Research International*, 107, 423-436. doi: 10.1016/j.foodres.2018.02.055.
- Macías-Ojeda, D. A., Cervantes-Arista, C., Pelayo-Zaldivar, C., Escalona-Buendía, H. B., Alia-Tejacal, I., y Mendoza-Espinoza, J. A. *et al.* (2019). Nuevos indicadores de vida comercial y calidad de naranja cv Valencia (*Citrus sinensis* Osbeck). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 18(3), 979-994. doi: 10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n3/Macias.
- Magdaleno-Hernández, A., García-Salazar, J. A., Omaña-Silvestre, J. M., Hernández-Romero, O., y Cruz-Galindo, B. (2015). Análisis competitivo de sistemas de producción de naranja (*Citrus sinensis*) en Nuevo León, México. *Agroproductividad*, 8(2), 52-59. Recuperado de: <https://biblat.unam.mx/es/revista/agroproductividad/articulo/analisis-competitivo-de-sistemas-de-produccion-de-naranja-citrus-sinensis-en-nuevo-leon-mexico>.



- Mahmoud, A. M., Ashour, M. B., Abdel-Moneim, A., y Ahmed, O. M. (2012). Hesperidin and naringin attenuate hyperglycemia-mediated oxidative stress and proinflammatory cytokine production in high fat fed/streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 26, 483-490. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2012.06.001.
- Makki, K., Froguel, P., y Wolowczuk, I. (2013). Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflammation*, 2013(139239), 1-12. doi: 10.1155/2013/139239.
- Manning, S., Pucci, A., y Finer, N. (2014). Pharmacotherapy for obesity: Novel agents and paradigms. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 5(3), 135-148. doi: 10.1177/2040622314522848.
- Mennah-Govela, Y. A., y Bornhorst, G. M. (2017). Fresh-squeezed orange juice properties before and during *In vitro* digestion as influenced by orange variety and processing method. *Journal of Food Science*, 82(10), 2438-2447. doi: 10.1111/1750-3841.13842.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., y Bourlieu, C. *et al.* (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food-an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113-1124. doi: 10.1039/c3fo60702j.
- Monente, C., Ludwig, I. A., Stalmach, A., De Peña, M. P., Cid, C., y Crozier, A. (2015). *In vitro* studies on the stability in the proximal gastrointestinal tract and bioaccessibility in Caco-2 cells of chlorogenic acids from spent coffee grounds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66(6), 657-664. doi: 10.3109/09637486.2015.1064874.

- Mosqueda-Solís, A., Lasa, A., Gómez-Zorita, S., Eseberri, I., Picó, C., y Portillo, M. P. (2017). Screening of potential anti-adipogenic effects of phenolic compounds showing different chemical structure in 3T3-L1 preadipocytes. *Food & Function*, 8(10), 3576–3586. doi: 10.1039/C7FO00679A.
- Musci, M., y Yao, S. (2017). Optimization and validation of Folin-Ciocalteu method for the determination of total polyphenol content of Pu-erh tea. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 68(8), 913-918. doi: 10.1080/09637486.2017.1311844.
- Nakajima, V. M., Macedo, G. A., y Macedo, J. A. (2014). Citrus bioactive phenolics: Role in the obesity treatment. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 1205–1212. doi: 10.1016/J.LWT.2014.02.060.
- OECD. (2017). Obesity Update 2017. Revisado de from Obesity Update 2017: <https://www.oecd.org/els/health-systems/Obesity-Update-2017.pdf>.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). Base de datos del Observatorio Global de la Salud (GHO). Revisado de Obesidad y sobrepeso: [http://www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/overweight/en/index1.html](http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/index1.html).
- OMS. (2018). Notas descriptivas: Obesidad y sobrepeso. Revisado de Notas descriptivas: Obesidad y sobrepeso: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
- Onal, G., Kutlu, O., Gozuacik, D., y Dokmeci Emre, S. (2017). Lipid droplets in health and disease. *Lipids in Health and Disease*, 16(128), 1-15. doi: 10.1186/s12944-017-0521-7.
- Park, A., Kim, W. K., Bae, K. H. (2014). Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem*

*Cells*, 6(1), 33-42. doi: 10.4252/wjsc.v6.i1.33.

Park, J-H., Lee, M., Park, E. (2014). Antioxidant activity of orange flesh and peel extracted with various solvents. *Preventive Nutrition and Food Science*, 19(4), 291-298, doi: 10.3746/pnf.2014.19.4.291.

Peña, L. (2014). *Papel de la fosfolipasa A2 citosólica grupo iva en la diferenciación adipocítica y en el desarrollo de la obesidad inducida por dieta alta en grasa [Tesis doctoral]*. Universidad de Valladolid. Revisado de: <http://hdl.handle.net/10261/117410>.

Pereira-Caro, G., Ludwig, I. A., Polyviou, T., Malkova, D., García, A., Moreno-Rojas, J. M., y Crozier, A. (2016). Identification of plasma and urinary metabolites and catabolites derived from orange juice (poly)phenols: analysis by High-Performance Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(28), 5724-5735. doi: 10.1021/acs.jafc.6b02088.

Petry, F. C., y Mercadante, A. Z. (2017). Impact of: *In vitro* digestion phases on the stability and bioaccessibility of carotenoids and their esters in mandarin pulps. *Food & Function*, 8(11), 3951-3963. doi: 10.1039/c7fo01075c.

Raciti, G. A., Fiory, F., Campitelli, M., Desiderio, A., Spinelli, R., y Longo, M. *et al.* (2018). *Citrus aurantium* L. dry extracts promote C/ ebp $\beta$  expression and improve adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *PLoS ONE*, 13(3), e0193704. doi: 10.1371/journal.pone.0193704.

Ramirez-Zacarias, J. L., Castro-Muñozledo, F., y Kuri-Harcuch, W. (1992). Histochemistry. *Histochemistry*, 97, 493–497.

- Rein, M. J., Renouf, M., Cruz-Hernandez, C., Actis-Goretta, L., Thakkar, S. K., y Da Silva Pinto, M. (2013). Bioavailability of bioactive food compounds: A challenging journey to bioefficacy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(3), 588-602. doi: 10.1111/j.1365-2125.2012.04425.x.
- Ribeiro, D. L., Pinto, M. E., Rafacho, A., Bosqueiro, J. R., Maeda, S. Y., y Anselmo-Franci, J. A. *et al.* (2012). High-fat diet obesity associated with insulin resistance increases cell proliferation, estrogen receptor, and PI3K proteins in rat ventral prostate. *Journal of Andrology*, 33(5), 854-865. doi: 10.2164/jandrol.111.016089.
- Richard, A. J., Amini-Vaughan, Z., Ribnicky, D. M., y Stephens, J. M. (2013). Naringenin inhibits adipogenesis and reduces insulin sensitivity and adiponectin expression in adipocytes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, ID 549750, 1-10. doi: 10.1155/2013/549750.
- Rocha-Peña, M.A., y Padrón-Chávez, J.E. (Eds.). 2009. El cultivo de los cítricos en el estado de Nuevo León. Libro Científico No. 1. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. *CIRNE*. Campo Experimental General Terán. México.
- Rodríguez-Mateos, A., Vauzour, D., Krueger, C. G., Shanmuganayagam, D., Reed, J., y Calani, L. *et al.* (2014). Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. *Archives of Toxicology*, 88(10), 1803-1853. doi: 10.1007/s00204-014-1330-7.
- Rodríguez-Roque, M. J., Rojas-Graü, M. A., Elez-Martínez, P., y Martín-Belloso, O. (2013). Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 136(1), 206-2012. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.07.115.

- Sahidi, F., y Peng, H. (2018). Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. *Journal of Food Bioactives*, 4, 11-68. doi: 10.31665/JFB.2018.4162.
- Santino, A., Scarano, A., De Santis, S., De Benedictis, M., Giovinazzo, G., y Chieppa, M. (2017). Gut microbiota modulation and anti-inflammatory properties of dietary polyphenols in IBD: New and consolidated perspectives. *Current Pharmaceutical Design* 23(16), 2344-2351. doi: 10.2174/1381612823666170207145420.
- Secretaría de Salud. (2016). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. (ENSANUT MC 2016). *Instituto Nacional de Salud Pública*.
- Singleton, V. L., y Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158. doi: 10.12691/ijebb-2-1-5.
- Sun, K., Kusminski, C. M., y Scherer, P. E. (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. *Journal of Clinical Investigation*, 121(6), 2094-2101. doi: 10.1172/JCI45887.
- Tang, Q. Q., y Lane, M. D. (2012). Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annual Review of Biochemistry*, 81, 715-736. doi: 10.1146/annurev-biochem-052110-115718.
- Tanti, J. F., Ceppo, F., Jager, J., y Berthou, F. (2013). Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. *Frontiers in Endocrinology* 3(181), 1-15. doi: 10.3389/fendo.2012.00181.
- Thilakarathna, S. H., y Vasantha Rupasinghe, H. P. (2013). Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients*, 5(9),

3367-3387. doi: 10.3390/nu5093367.

Tordjman, J. (2013). Histology of adipose tissue. *Physiology and Physiopathology of Adipose Tissue*, 67-75. doi: 10.1007/978-2-8178-0343-2\_6.

Torres-Villarreal, D., Camacho, A., Castro, H., Ortiz-Lopez, R., y de la Garza, A. L. (2018). Anti-obesity effects of kaempferol by inhibiting adipogenesis and increasing lipolysis in 3T3-L1 cells. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 75(1), 83-88. doi: 10.1007/s13105-018-0659-4.

Vinayagam, R., y Xu, B. (2015). Antidiabetic properties of dietary flavonoids: A cellular mechanism review. *Nutrition and Metabolism*, 12(60), 1-20. doi: 10.1186/s12986-015-0057-7.

Visnagri, A., Kandhare, A. D., Chakravarty, S., Ghosh, P., y Bodhankar, S. L. (2014). Hesperidin, a flavanoglycone attenuates experimental diabetic neuropathy via modulation of cellular and biochemical marker to improve nerve functions. *Pharmaceutical Biology*, 52(7), 814-828. doi: 10.3109/13880209.2013.870584.

Wang, W., y Seale, P. (2016). Control of brown and beige fat development. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 17(11), 691-702. doi: 10.1038/nrm.2016.96.

Xi, W., Lu, J., Qun, J., y Jiao, B. (2017). Characterization of phenolic profile and antioxidant capacity of different fruit part from lemon (*Citrus limon* Burm.) cultivars. *Journal of Food Science and Technology*, 54(5), 1108-1118. doi: 10.1007/s13197-017-2544-5.

Yang., I., Jayaprakasha, G., y Patil, B. S. (2018). *In vitro* digestion with bile acids enhances the bioaccessibility of kale polyphenols. *Food & Function*, 9(2),

1235-1244. doi: 10.1039/c7fo01749a.

Yeo, E.-J., Lim, H. K., y Park, S. C. (2000). Effect of short-term ethanol on the proliferative response of Swiss 3T3 cells to mitogenic growth factors. *Experimental & Molecular Medicine*, 32(3), 161-169. doi: 10.1038/emm.2000.27.

Yoshida, H., Watanabe, W., Oomagari, H., Tsuruta, E., Shida, M., y Kurokawa, M. (2013). Citrus flavonoid naringenin inhibits TLR2 expression in adipocytes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(7), 1276-1284. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.10.003.

## ANEXOS

### Resumen Curricular

Gloria Itzel Peña Vázquez

Candidata para el grado de Maestría en Ciencias en Nutrición

#### Tesis

### **BIOACCESIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE NARANJA DULCE (*Citrus sinensis*) Y SU EFECTO SOBRE LA ACUMULACIÓN LIPÍDICA EN CÉLULAS 3T3-L1**

**Campo de estudio:** Investigación básica

**Datos Personales:** Nacida en Monterrey, Nuevo León el 10 de diciembre de 1994, hija de Humberto Peña Garza y Gloria Elvira Vázquez Granados

**Educación:** Egresada en 2017 de la Licenciatura en Nutrición por la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la UANL (Cédula Profesional. 11119703).

#### **Asistencia a congresos**

1. XXXIV Congreso Nacional de Nutrición AMMFEN (Marzo, 2019).
  - Cartel 1: Niveles séricos de leptina de ratas hembra alimentadas con dieta obesogénica y su asociación con el peso al nacer de su descendencia.
  - Cartel 2: correlación de los compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante de la naranja dulce (*Citrus sinensis*) durante un proceso de digestión *in vitro*.

#### **Estancias de investigación en instituciones académicas internacionales**

Estancia de investigación internacional en la Universidad de Navarra (España) con Dra. María Paz de Peña Fariza con el objetivo de evaluar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos de naranja dulce (*C. sinensis*) durante un proceso de digestión *in vitro*. Periodo Septiembre-Diciembre 2018



### **Cursos y talleres**

1. **Curso:** Principios básicos de la electroforesis 2D (BIO-RAD) (Mayo, 2019)
2. **Taller:** Interacción fármaco-alimento en el XXXIII Congreso de Nacional de Nutrición AMMFEN (Abril, 2018)

### **Experiencia profesional**

1. Trabajo experimental con modelos animales
2. Técnicas espectrométricas (HPLC-ESI-DAD-QTOF-MS/MS)
3. Proceso *in vitro* de digestión gastrointestinal y diálisis
4. Trabajo experimental en cultivo celular