

**Evaluación del perfil de polifenoles y actividad antioxidante a lo largo del proceso de vinificación de uvas blancas.
Evaluación de la resistencia química en un modelo de digestión gástrica *in vitro*.**

Trabajo final Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Paula Celeste Kruzynski



Lugar de Trabajo:

ISIDSA: Instituto superior en Investigación Desarrollo y Servicios en Alimentos. SECyT-UNC

ICYTAC: Instituto de Ciencia y Tecnología en Alimentos Córdoba. CONICET - UNC

CIBICI: Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (UNC-CONICET).

2021

Director de Tesis:

Dra. M. Verónica Baroni (UNC)

Co- Director de Tesis:

Dr. Martín Theumer

Comisión de Tesis

Dra. Nilda Perovic

Dra. Mariela Bustos

Evaluador Externo

Dra. María Liza López

ÍNDICE

1. INTRODUCCION.....	1
1.1 Estrés oxidativo.	1
1.2 Polifenoles y estrés oxidativo.	2
1.3 Métodos químicos utilizados para evaluar el poder antioxidante de los polifenoles.	3
1.4 Métodos biológicos utilizados para evaluar el poder antioxidante de los polifenoles.	4
1.5 Efecto de la digestión gastrointestinal sobre el perfil y poder antioxidante de polifenoles.....	7
1.5.1 Biodisponibilidad.	7
1.6 La uva y el vino: Alimentos ricos en compuestos fenólicos.	9
1.6.1 La Uva.	10
1.6.1.2 Morfología de la uva.	10
1.6.2 El Vino.....	11
1.6.2.1 Elaboración del vino blanco.	12
1.6.2.2 Composición química del vino.	14
1.6.3 El vino y sus propiedades naturales.....	16
1.6.4 Composición fenólica del vino.	17
1.6.4.1 Ácidos fenólicos.	17
1.6.4.2 Flavonoides	19
1.6.4.3 Estilbenos	19
1.7 Importancia del estudio.	20
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo General:	22
2.2 Objetivos Específicos:	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1 Muestras.....	23
3.2 Extracción de compuestos polifenólicos de uvas.	23
3.3 Contenido de Polifenoles Totales- Técnica de Folin-Ciocalteu.	24
3.4 Perfil de polifenoles por HPLC-MS/MS.....	24
3.5 Análisis de Capacidad Antioxidante <i>in vitro</i>.....	26

3.5.1 Ensayo FRAP.....	26
3.5.2 Ensayo ABTS.....	27
3.5.3 Ensayo DPPH.....	28
3.6 Digestión gastro-intestinal simulada	29
3.7. Análisis de la Capacidad Antioxidante en células Caco-2:.....	31
3.7.1 Estandarización de cultivos celulares y estrés oxidativo.....	31
3.7.2 Evaluación de la citotoxicidad y capacidad antioxidante ex vivo de extractos de polifenoles.....	32
3.7.3 Ensayo del MTT.....	32
3.8 Obtención de imágenes microscópicas de células Caco-2.....	33
3.9 Análisis estadísticos de los datos.....	33
3.9.1 Estadística Descriptiva.....	33
3.9.2 Estadística Inductiva- Análisis de la Varianza (ANOVA).....	34
4. RESULTADOS Y DISCUSION	35
4.1 Contenido de Polifenoles en uva y vino blanco.....	35
4.1.1 Contenido de Polifenoles Totales (PT).....	35
4.2 Identificación de compuestos polifenólicos por HPLC-DAD-ESI-QTOF.....	36
4.2.1 Flavonoles	38
4.2.2 Flavanoles.....	39
4.2.3 Ácidos Hidroxicinámicos (AHC).....	39
4.2.4 Ácidos Hidroxibenzoicos (AHB).....	40
4.3 Cuantificación de polifenoles en las muestras.....	40
4.3.1 Ácidos Hidroxicinámicos (AHC).....	40
Tabla 4.2 Contenido de polifenoles en muestras tomadas de dos variedades blancas.....	41
Los resultados se expresan como media ± desviación estándar.....	41
4.3.2 Ácidos Hidroxibenzoicos (AHB).....	41
4.3.3 Flavonoles.....	42
4.3.4 Flavanoles.....	42
4.4 Actividad antioxidante <i>in vitro</i>.....	42
4.5 Proceso de digestión gastro-intestinal <i>in vitro</i>.....	45
4.6 Capacidad Antioxidante <i>in vitro</i>	51
4.7 Evaluación de la capacidad antioxidante <i>ex vivo</i>.....	53

4.7.1. Tratamiento oxidante sobre células Caco-2: Elección de la concentración de H ₂ O ₂	53
4.7.2. Evaluación de la toxicidad de los extractos de polifenoles para las células Caco-2:	56
4.7.3. Evaluación de las actividades antioxidantes de los extractos de polifenoles sobre las células Caco-2.....	58
5. CONCLUSIONES	60
6. BIBLIOGRAFIA	61

RESUMEN

En las últimas décadas, los polifenoles han sido el tema de una gran cantidad de trabajos publicados debido a su importancia medicinal como antioxidantes, agentes antitumorales y su papel en la prevención de enfermedades crónicas. Además, un aumento en el consumo de frutas ha sido asociado con una disminución en el riesgo de tales enfermedades degenerativas, debido principalmente al alto contenido de polifenoles en las mismas.

El objetivo de esta tesis fue evaluar los cambios en las características antioxidantes, y sus relaciones con los perfiles polifenólicos, debido al proceso de vinificación y digestión gastro-intestinal de uvas blancas y su correspondiente vino. Se estudiaron muestras de uva blanca y del producto final de elaboración, el vino de las variedades Chardonay y Viognier. Se estudió el contenido de polifenoles totales (PT) por la técnica de Folin-Ciocalteu y el perfil de compuestos polifenólicos por HPLC-DAD-ESI-QTOF. La capacidad antioxidante (CA) se evaluó mediante ensayos *in vitro* (FRAP, ABTS y DPPH) y ensayos de cultivo celular (Caco-2).

Los resultados obtenidos del estudio del contenido de polifenoles totales (PT) demostraron que para uva, la variedad Chardonay se caracterizó por el mayor contenido de PT, sin embargo no se observaron diferencias significativas para las muestras de vino. El perfil de polifenoles estuvo caracterizado por la presencia de flavonoles, derivados del ácido hidroxicinámico y en menor medida, flavanoles y derivados del ácido hidroxibenzoico. Con respecto a la capacidad antioxidante *in vitro*, se observó una fuerte correlación con el contenido total de polifenoles para ambas matrices.

Se estudió la estabilidad y bioaccesibilidad de los polifenoles de la uva y el vino, utilizando un modelo que simula la digestión gastro-intestinal humana y posterior absorción a través del epitelio intestinal. Se observó que el contenido total y el perfil de polifenoles se modificó a lo largo del proceso digestivo como consecuencia de los cambios de pH y la actividad de las enzimas digestivas. Menos del 50 % de los polifenoles iniciales fueron detectados en la fracción biodisponible (aquellos que atravesarían la pared del intestino), y en la fracción colon viable (aquellos que quedarían retenidos en el intestino grueso). Para las muestras de uva, el polifenol más resistente a la digestión simulada fue el ácido gálico glucósido, mientras que para el vino los más resistentes fueron derivados del ácido hidroxicinámico como los ácidos coutárico,

caftarico y fertárico. La capacidad antioxidante *in vitro* también se vio afectada por el proceso de digestión con una tendencia similar al contenido de polifenoles.

Por otro lado, también se evaluó la actividad biológica de los extractos polifenólicos, mediante la prevención de la muerte de las células Caco-2 causada por estrés oxidativo. A una misma concentración de polifenoles, tanto las muestras digeridas como las no digeridas, mostraron resultados similares, evidenciando que las diferencias surgidas en el perfil como consecuencia de la digestión, no afectaron la actividad biológica de las mismas.

1. INTRODUCCION

1.1 Estrés oxidativo.

En los últimos años numerosos estudios sugieren que muchas de las enfermedades crónicas padecidas por la sociedad moderna, entre las que se mencionan las neurodegenerativas, cardiovasculares, diferentes tipos de cáncer, obesidad, e incluso el envejecimiento, están asociadas al daño oxidativo que sufre el organismo causado por los radicales libres (Sen *et al.*, 2011).

Se denominan radicales libres a todo átomo, ión o molécula con uno o más electrones desapareados en su estructura electrónica, lo cual los hace altamente inestables y reactivos frente a otras moléculas. Además de las especies radicalarias, existen otros compuestos o especies reactivas que no son formalmente radicales libres. Dependiendo del elemento del que derivan se clasifican en: especies reactivas de oxígeno (EROs), especies reactivas de nitrógeno (ERNs) y especies reactivas de azufre (ERSs). Las EROs incluyen a los radicales libres anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidropéroxilo (HO_2^{\cdot}), radical hidroxilo (HO^{\cdot}), óxido nítrico (NO), y otras especies como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (1O_2) y ácido hipocloroso (HOCl). (Carocho & Ferreira, 2013).

Muchas EROs son continuamente producidas en el organismo como consecuencia del metabolismo normal de las células, a partir del oxígeno molecular que consumimos (O_2) para obtener energía. Por lo tanto, esta generación de EROs es un aspecto inevitable en la vida de los organismos aerobios (Lushchak, 2011). Las EROs juegan un rol importante en la señalización celular y la neurotransmisión, y también mantienen la homeostasis en los tejidos normales (Yamamoto, 2000).

Por otra parte, el hombre está expuesto permanentemente a diferentes factores ambientales, como radiaciones ionizantes, rayos UV, tabaco, radiación gamma, aerosoles químicos, entre otros, que también estimulan la producción de estas especies reactivas en sus células (Limón-Pacheco & Gonsebatt, 2009).

En condiciones normales, al mismo tiempo que las EROs son generadas, también son eliminadas mediante un sofisticado sistema de defensa antioxidante endógeno, logrando un estado de equilibrio en la célula (Lushchak, 2011). Sin embargo, la generación de EROs en exceso conduce a un desequilibrio en el balance antioxidante/pro-oxidante del cuerpo humano denominado “estrés oxidativo” (Limón-

Pacheco & Gonsebatt, 2009). Dependiendo de la magnitud de dicho estrés, como resultado se pueden tener células con daños oxidativos subletales, es decir que las alteraciones de sus biomoléculas no comprometen la viabilidad celular. Pero cuando los daños superan un determinado umbral, se puede conducir a la muerte de las células en forma secundaria al estrés oxidativo. En este contexto, la prevención de la citotoxicidad causada por un oxidante puede ser considerada como un indicador de la actividad antioxidante de una sustancia o de una mezcla de compuestos.

Muchos estudios demuestran que el daño oxidativo causado por estos agentes pro-oxidantes se encuentra estrechamente asociado a la patogénesis de diversas enfermedades crónicas y degenerativas del hombre, como afecciones del sistema nervioso, cardiovascular, endócrino y renal, o en enfermedades como cáncer y procesos inflamatorios (Lobo *et al.*, 2010).

1.2 Polifenoles y estrés oxidativo.

Un antioxidante puede ser definido como cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones en relación a las biomoléculas como sustratos oxidables, puede prevenir, reducir o retrasar la destrucción oxidativa de las mismas (Halliwell, 1995). Según el mecanismo de acción por el cual ejercen su efecto se clasifican en antioxidantes preventivos (previenen la formación de radicales libres), antioxidantes captadores de radicales libres (interfiriendo de este modo en la propagación de las reacciones en cadena de radicales libres) y antioxidantes involucrados en la reparación del proceso de oxidación (Carocho & Ferreira, 2013). Los antioxidantes biológicos naturales pueden clasificarse de acuerdo a su origen en endógenos o exógenos.

Dentro de los antioxidantes exógenos se encuentran los polifenoles. Estos son un grupo muy heterogéneo de fitoquímicos que derivan del metabolismo secundario de las plantas. Muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores, o animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento. Otros tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas (Ávalos García & Pérez-Urria Carril, 2009).

Los polifenoles son capaces de proteger a los constituyentes celulares frente al daño oxidativo generado por la sobreproducción de radicales libres, evitando de este modo los efectos del deterioro de las proteínas, ácidos nucleicos y lípidos celulares

(Rice-Evans, 2001). Por este motivo pueden reducir el riesgo de contraer enfermedades asociadas al estrés oxidativo. Aunque en la actualidad no se han identificado claramente los mecanismos de acción de estos compuestos, numerosos estudios de laboratorio indican que su elevada capacidad antioxidante puede considerarse como la actividad biológica fundamental para la promoción de la salud y prevención de dichas enfermedades en el hombre (Gaté *et al.*, 1999).

El poder antioxidante de estos compuestos deriva de sus características estructurales, presencia de sustituyentes donadores de electrones o hidrógenos con potenciales de reducción apropiados para reducir al radical libre y capacidad para estabilizar el radical fenoxilo generado, permitiéndoles actuar como: captadores de radicales libres, agentes reductores y quelantes de metales de transición implicados en el proceso de oxidación. También han demostrado ejercer dicha actividad biológica inhibiendo la actividad de enzimas oxidantes y/o modulando la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en la protección celular (Procházková *et al.*, 2011).

1.3 Métodos químicos utilizados para evaluar el poder antioxidante de los polifenoles.

En la actualidad, numerosos métodos químicos *in vitro* han sido desarrollados para evaluar la capacidad antioxidante de un compuesto puro, extracto o alimento funcional. Además de la metodología tradicionalmente utilizada como los ensayos ORAC (capacidad de captación de radicales oxigenados), TRAP (parámetro antioxidante de captación de radicales), y oxidación de LDL (lipoproteína de baja densidad), se ha adoptado el uso de ensayos que involucran la utilización de compuestos coloreados debido a que brindan sencillez, rapidez, bajo costo y buena reproducibilidad (Brand-Williams *et al.*, 1995; Magalhães *et al.*, 2008; Re *et al.*, 1999). Ejemplos de éstos los constituyen los métodos FRAP (poder antioxidante de reducción del ión férrico), que evalúa el poder reductor de un antioxidante por medio de su capacidad para donar electrones y reducir el ión férrico a ferroso, ABTS y DPPH, donde ambos miden la capacidad de captación de radicales libres de un antioxidante, radical catión 2,2'-azino-bis (3-etilenbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS^{•+}) y radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]), respectivamente. Es importante destacar que, debido a que estos métodos se diferencian en términos del principio y condiciones experimentales de ensayo, la utilización de un único método no refleja la verdadera capacidad antioxidante

de una mezcla compleja de polifenoles y, por lo tanto, la utilización de al menos dos de ellos ha sido sugerida (Magalhães *et al.*, 2008; Moon & Shibamoto, 2009; Niki, 2011).

Sin embargo, los resultados obtenidos por estos ensayos no pueden ser claramente extrapolados a los sistemas vivos, ya que el efecto biológico real de estos compuestos en el organismo es afectado por problemas de permeabilidad, absorción a través de membranas, distribución en diferentes órganos y tejidos, reacciones con biomoléculas, y efectos secundarios de los productos de sus reacciones con pro-oxidantes y de su metabolismo celular (Wolfe & Liu, 2008). Por lo tanto, los mecanismos de acción de los antioxidantes para la prevención de enfermedades relacionadas al estrés oxidativo y promoción de la salud, van más allá de su capacidad de captación de radicales libres o poder reductor (Liu & Finley, 2005).

1.4 Métodos biológicos utilizados para evaluar el poder antioxidante de los polifenoles.

En los últimos años, con el objetivo de imitar la complejidad de los sistemas biológicos, se ha propuesto la utilización de modelos celulares para el estudio de la capacidad antioxidante, previo a los costosos y prolongados ensayos con animales y estudios clínicos (Liu & Finley, 2005; Wolfe & Liu, 2007). Estos ensayos de capacidad antioxidante celular permiten una evaluación rápida, más precisa y biológicamente más relevante de la potencial capacidad antioxidante de nuevos compuestos, extractos, o alimentos funcionales, permitiendo además el estudio de los mecanismos moleculares por los cuales dichos compuestos podrían estar ejerciendo su potencial bioactividad (Wolfe & Liu, 2007).

Las líneas celulares de origen animal o humano se han adaptado a vivir en cultivo, poseen capacidad de proliferación ilimitada, debido a que han sufrido un proceso de transformación, que puede ocurrir espontáneamente, ser inducido por compuestos químicos, radiaciones o virus; que implica la alteración de las características de crecimiento (Freshney, 2000).

Las líneas celulares establecidas se pueden dividir en dos tipos principales: adherentes (células en monocapa) que se fijan al material plástico de un frasco o placa y por lo tanto tienen que desprenderse de esa superficie, y no adherentes (células en suspensión) que normalmente no se fijan a la superficie del recipiente de cultivo (Morgan & Darling, 1995).

La propagación de líneas celulares requiere que el número de células aumente continuamente, las condiciones de cultivo han sido seleccionadas para favorecer al máximo la proliferación celular. Estas condiciones son: baja densidad celular, baja concentración de Ca^{2+} y la presencia de factores de crecimiento. Dentro de los requerimientos generales de un cultivo de líneas celulares se cuentan: el medio de cultivo nutritivo, condiciones de pH, temperatura y ambiente controlado. El medio nutritivo básicamente debe ser un medio líquido, que contenga una fuente de carbono, aminoácidos esenciales, oligoelementos, un sistema regulador de pH, iones y factores de crecimiento aportados por el suero fetal bovino (FBS) con el que generalmente se suplementa el medio. Adicionalmente los medios de cultivo celular contienen rojo de fenol como indicador de pH, para permitir un constante monitoreo de esta variable (Freshney, 2000). Después de preparar el medio básico deben ser añadidos otros suplementos, de modo que pueda utilizarse en el cultivo celular, como por ejemplo antibiótico para disminuir el riesgo de contaminación por microorganismos y suero que proporciona una serie de nutrientes importantes para las células (Alvarado *et al.*, 2002).

La línea celular Caco-2 fue establecida por Fogh *et al.* (1977) a partir de un adenocarcinoma de colon humano obtenido de un paciente de 72 años. Las células en cultivo crecen formando monocapas. Cuando alcanzan confluencia se diferencian espontáneamente adquiriendo características morfológicas y bioquímicas del enterocito maduro: organización en una capa monocelular, uniones estrechas intercelulares, presencia de canales, funciones de transporte, expresión de proteínas y enzimas esenciales en la absorción de nutrientes, entre otras (Herold *et al.*, 1994). Las células del epitelio gastrointestinal humano no pueden utilizarse directamente para la realización de estos estudios porque, aunque se obtienen fácilmente, no son susceptibles de formar monocapas celulares, imprescindibles para realizar ensayos de absorción (Rousset *et al.*, 1986).

Las células Caco-2, se han utilizado como modelo normalizado para estimar la biodisponibilidad de los micronutrientes, considerándose como un buen modelo de permeabilidad (Guyton, 2001). Si bien se trata de una línea de células epiteliales de carcinoma colorrectal humano, cuando se cultivan en condiciones específicas las células se diferencian y polarizan de tal manera que su fenotipo morfológico y funcional, se asemeja a los enterocitos que recubren el intestino delgado. El modelo ha sido desarrollado para ensayos farmacológicos y más recientemente se utilizó para evaluar el transporte y/o acumulación de fitoquímicos puros como quercetina, quercetin glucósido,

flavona y proantocianidina, así como la biodisponibilidad de carotenoides (Boyer *et al.*, 2004; Garret *et al.*, 2000). Además, las células Caco-2 han sido ampliamente utilizadas para estimar la toxicidad a nivel intestinal de numerosos xenobióticos que ingresan al organismo mediante la ingesta de alimentos contaminados (Ponce de León-Rodríguez *et al.*, 2019).

La toxicidad de los compuestos químicos se basa en dos pilares básicos, el sustrato biológico y los indicadores de toxicidad. El sustrato es el material generalmente orgánico, vivo o no, sobre el que se aplica *in vitro* el xenobiótico. Estas alteraciones se valoran mediante indicadores de toxicidad, que son los parámetros que se determinan para cuantificar las modificaciones producidas en la estructura o fisiología de los componentes del sustrato de ensayo (Repetto, 1995). Frecuentemente, células en cultivo se exponen a un compuesto en estudio, y después de un período de incubación se mide un marcador para reflejar su eventual citotoxicidad.

Existen varios marcadores de toxicidad celular. Entre los métodos más comúnmente utilizados se encuentran: a) los basados en colorantes que penetran y tiñen selectivamente las células cuyas membranas plasmáticas han perdido su integridad (azul de tripan, colorantes fluorescentes que se unen al ADN, etc); b) los basados en la cuantificación de marcadores intracitoplasmáticos liberados al medio de cultivo por las células muertas (actividad lactato deshidrogenasa, LDH; etc); y c) los basados en la medición de algún aspecto del metabolismo general o una actividad enzimática como marcador de células viables (reducción de sales de tetrazolio, reducción de resazurina, marcadores de proteasa, etc). Los métodos basados en la reducción de tetrazolio se han adaptado a formatos de placas de pocillos múltiples, en las cuales se registran las absorbancias mediante lectores de placas, incrementándose sensiblemente la capacidad para evaluar varias concentraciones de xenobióticos, por ejemplo.

El MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] es una sal de tetrazolio color amarillo que se utiliza para medir la actividad y viabilidad celular por el rompimiento causado por la reducción (aceptación de un H⁺) del anillo de la sal de tetrazolio MTT por acción de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales (succinato–deshidrogenasas), para formar unos cristales azules de formazán insolubles en agua, pero solubles en dimetilsulfóxido (DMSO) (Figura 1.1). En el Método del MTT, la viabilidad celular es proporcional a la absorbancia que presentan las soluciones formadas mediante la disolución de los cristales de formazán (Angel, 1999).

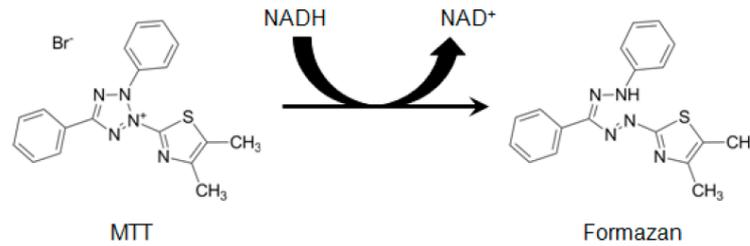


Figura 1.1. Metabolización de MTT a sales de formazán por células viables.

1.5 Efecto de la digestión gastrointestinal sobre el perfil y poder antioxidante de polifenoles.

Los compuestos bioactivos que provienen de los alimentos deben ser capaces de resistir las condiciones del tracto gastro-intestinal y además ser capaces de atravesar la membrana del intestino delgado para poder ejercer un efecto beneficioso sobre la salud del hombre (Manach *et al.*, 2004 y 2005). En este sentido, la biodisponibilidad se define como la proporción de nutrientes que se digiere, absorbe y metaboliza para estar disponible en su sitio de acción (Srinivasan, 2001). Para entender la biodisponibilidad de un compuesto en primer lugar debemos estudiar su bioaccesibilidad, definida como la fracción de un compuesto que se libera desde la matriz del alimento en el lumen gastrointestinal, y de ese modo queda disponible para ser absorbido en el intestino (Saura-Calixto *et al.*, 2007). Esta absorción puede estar influenciada por la solubilidad del compuesto, la interacción con otros ingredientes del alimento, transformaciones moleculares, diferentes transportes celulares, metabolismo y la interacción con la microbiota intestinal (D'Archivio *et al.*, 2010; Manach *et al.*, 2004).

1.5.1 Biodisponibilidad.

En estudios nutrimentales el concepto de biodisponibilidad se define como la eficiencia con la cual los nutrientes son utilizados. La biodisponibilidad depende de los procesos de digestión de los alimentos, mecanismos de absorción de nutrientes y disponibilidad de los mismos para realizar las funciones metabólicas (Crespo, 2002).

Como etapa previa a la estimación de la biodisponibilidad de nutrientes en seres humanos los métodos *in vitro* son de gran utilidad. Cabe señalar que lo óptimo es realizar estudios *in vivo*, sin embargo su costo y largo tiempo que involucran se tornan en ocasiones limitantes (Boyer *et al.*, 2004). Como alternativa de estudio previo, los

modelos *in vitro* son métodos rápidos, de menor costo y con buena reproducibilidad. Se basan fundamentalmente en simular una digestión gastrointestinal y permitir dar una estimación de la fracción que teóricamente podría ser captada por la mucosa intestinal (Crespo, 2002).

La absorción de nutrientes se lleva a cabo en el intestino delgado. Sobre la superficie de éste existen millones de pequeñas vellosidades. Su presencia en la superficie de la mucosa hace que el área de absorción se incremente. Cada vellosidad tiene una red de capilares y un vaso linfático cubiertos por distintas células, siendo las más abundantes las absorbentes, llamadas enterocitos (Figura 1.2) (Crespo, 2002).

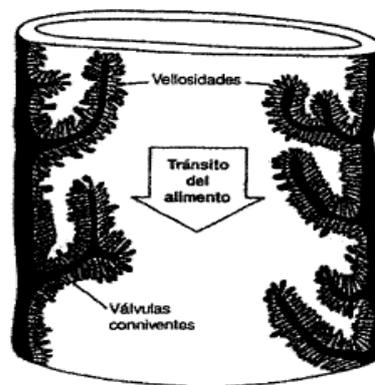


Figura 1.2 Corte longitudinal del intestino delgado mostrando vellosidades intestinales (Crespo, 2002).

Mientras que el intestino delgado está especializado en la absorción de nutrientes, la función más importante del colon es la reabsorción de agua desde el lumen intestinal, evitando así su pérdida y a la vez aumentando la consistencia de las heces.

Si bien existen diferencias funcionales entre el intestino delgado y colon, los xenobióticos que ingresan con la dieta van a tener un primer contacto con todas las células epiteliales que revisten la cara luminal del tracto gastrointestinal. De esto se deduce la importancia de consumir alimentos que, además de estar contaminados con xenobióticos, contengan sustancias que puedan prevenir sus efectos tóxicos por el contacto directo con el epitelio gastrointestinal, y con el resto de los tejidos tras la absorción y metabolismo de dichos xenobióticos.

Numerosos factores son los que influyen en la biodisponibilidad de un compuesto, entre ellos se destacan: su bioaccesibilidad, su estabilidad bajo las

condiciones gastro-intestinales y su absorción (Tagliazucchi *et al.*, 2010). Solo aquellos compuestos fenólicos liberados de la matriz del alimento por acción de las enzimas digestivas y la microflora bacteriana estarán bioaccesibles en el intestino. De esta manera, podrían difundir a través del epitelio intestinal e ingresar al torrente sanguíneo, desde donde se distribuyen a órganos y tejidos, para ejercer su potencial bioactividad en el organismo.

Algunos de los compuestos antioxidantes de los alimentos son relativamente poco absorbidos en el intestino (su absorción varía entre 0,3 % a 43 %), por lo que la concentración de sus metabolitos en plasma puede ser muy baja (Manach *et al.*, 2005). El resto de los polifenoles llega al colon, principalmente los esterificados, glicosilados o polimerizados, donde son fermentados por la microflora colónica, dando lugar a metabolitos que se absorben y aparecen como derivados conjugados en el plasma, a través del cual se distribuyen a órganos y tejidos (Clifford, 2004). Una vez absorbidos y metabolizados, estos compuestos se distribuyen a todo el organismo e incluso pueden volver al duodeno a través de la circulación general, prolongando su presencia en el organismo, o bien pueden ser eliminados por orina (Manach *et al.*, 2004).

En los últimos años, el ensayo de digestión gastro-intestinal *in vitro* ha sido ampliamente utilizado para el estudio de la estabilidad y biodisponibilidad de los compuestos polifenólicos presentes en los alimentos. Es un modelo experimental que simula el proceso de digestión gastro-intestinal humana y, opcionalmente, su posterior absorción a través del intestino delgado. Además, posibilita el acople del análisis químico de los alimentos con la fisiología humana permitiendo predecir el comportamiento *in vivo* de sus componentes (Hur *et al.*, 2011).

1.6 La uva y el vino: Alimentos ricos en compuestos fenólicos.

Los compuestos polifenólicos además de contribuir a propiedades sensoriales del producto (aroma, color, amargor) tienen una importancia medicinal como antioxidantes, previniendo enfermedades crónicas, como puede ser cáncer y enfermedades coronarias (Gumienna *et al.*, 2011).

Químicamente los compuestos polifenólicos se caracterizan por presentar en su estructura molecular al menos un anillo aromático sustituido por una o más funciones hidroxílicas (Liu, 2004).

1.6.1 La Uva.

La uva, es el fruto obtenido de la vid, un arbusto de la familia de las Vitáceas. Dentro de este género existen alrededor de 60 especies, de las cuales la *Vitis vinífera* L., de origen europeo, es la única especie de vid que proporciona uvas aptas para la vinificación.

La vid constituye en general una de las especies frutales más importantes gracias a sus extraordinarias características de propagación. Tras sufrir una evolución de planta leñosa a enredadera, esta antigua especie se ha domesticado con facilidad, y en la actualidad su fruto constituye la base de las industrias más importantes del mundo (Pretorius, 2004). De las muchas variedades que existen de la especie vinífera sólo una minoría (aproximadamente una centena) es utilizada para la elaboración de vinos.

1.6.1.2 Morfología de la uva.

La uva es una baya que nace de color verde pero va cambiando de tonalidad durante su desarrollo. La forma y el tamaño de la uva también varían de acuerdo con la especie. En general las uvas de vinificación son más pequeñas que las de mesa; de unos 12 a 18 mm promedio del grano, y pesan entre 1 o 2 g. Presentan una piel gruesa, una pulpa jugosa, y un alto contenido de azúcares simples. Los granos o bayas forman racimos que pueden tener diferentes tamaños y aspectos. Están recubiertos por la *pruina*, una membrana cerosa que los vuelve casi impermeables (hidrofóbica), les da el brillo a los granos y además les permite atraer las levaduras, bacterias, mohos y otros microorganismos que producen la fermentación (Menendez, 2012).

Su desarrollo presenta dos períodos de crecimiento sigmoideal separados por una fase de latencia en la que no hay cambio de tamaño (Conde *et al.*, 2007). Durante la primera fase de crecimiento se generan todas las estructuras de la baya, conjuntamente con el aumento de su tamaño. Al final de esta fase, los frutos son verdes y duros. La baya entra luego en la fase de latencia, cuya duración es dependiente de la variedad. Los solutos más importantes que se acumulan durante esta fase de crecimiento son los ácidos orgánicos: málico y tartárico, y compuestos fenólicos como los ácidos hidroxicinámicos y flavanoles. La segunda fase de crecimiento se caracteriza por la acumulación de compuestos que contribuyen al color, como antocianos y flavonoles, al aroma del fruto, y por el ablandamiento del mismo. Asimismo, durante esta fase se produce la acumulación de agua y azúcares solubles simples como glucosa y fructosa (Conde *et al.*, 2007).

El racimo está conformado por un tallo principal del que salen diversas ramificaciones, que se conocen como “raspón” o “escobajo”. La uva, a su vez, consta de diversas partes: la piel u hollejo, la pulpa y las semillas o pepitas (Figura 1.3)

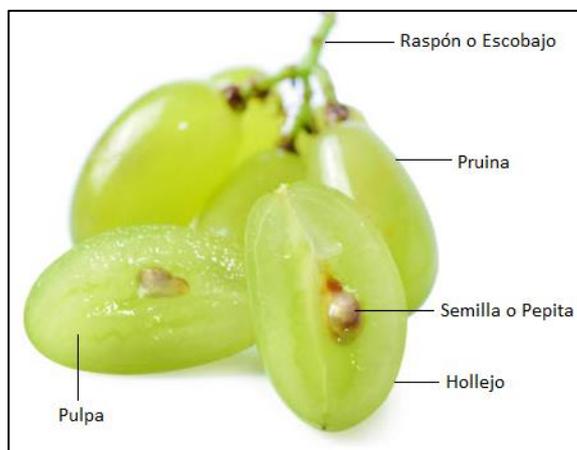


Figura 1.3 Las partes de la uva.

El *hollejo* es la membrana externa del fruto que lo protege. En él se encuentran gran cantidad de compuestos fenólicos como antocianos, flavonoles, flavanoles, estilbenos y ácidos hidroxicinámicos que le dan color y aroma al vino. De hecho, el hollejo cambia de color con el inicio de la maduración; en su primera fase es de color verde, luego muta al amarillo en las variedades blancas y en rojizo o violáceo en las variedades tintas (Menendez, 2012).

La *pulpa* representa la mayor parte del fruto. En la mayoría de las especies es translúcido, incluso en algunas variedades tintas. Los componentes fundamentales de la pulpa son el agua, los azúcares (glucosa y fructosa), los ácidos (especialmente el cítrico, el málico y el tartárico), y compuestos fenólicos del tipo hidroxicinámicos (Menendez, 2012).

Dentro de la pulpa se ubican las *semillas o “pepitas”*, que contribuyen fundamentalmente con flavanoles y ácidos hidroxibenzoicos (Conde *et al.*, 2007).

1.6.2 El Vino.

Se denomina vinos genuinos a los obtenidos por la fermentación alcohólica de la uva fresca y madura o del mosto de la uva fresca. Su graduación alcohólica no puede ser inferior al 8,5 % (INV; 1989), ley N° 14.878.

1.6.2.1 Elaboración del vino blanco.

El vino blanco es una variedad de vino que puede oscilar entre las tonalidades amarillo pajizo, amarillo verdoso o amarillo oro. Se produce por la fermentación alcohólica de la pulpa no coloreada de uvas que pueden tener una piel de color blanco o negro, a fin de mantener un color amarillo transparente en el producto final. La amplia variedad de vinos blancos proviene de la gran cantidad de cepas y métodos de elaboración empleados, así como de la relación de azúcar residual. Las uvas blancas que producen principalmente vinos blancos son de color verde o amarillo, una variedad muy extendida en el mundo, por lo cual este vino es producido en muchas zonas del planeta. Algunas variedades son muy conocidas, como la chardonay, sauvignon y la riesling. También hay variedades de uva negra, como la pinot noir, utilizadas para producir vino blanco o champán.

El proceso de elaboración cumple con una serie de etapas compartidas para la gran mayoría de las variedades, que se describen a continuación (Menendez, 2012):

A- Recolección y transporte de los racimos de uva. Entre los meses de marzo y abril tiene lugar la cosecha o vendimia en el hemisferio sur.

B- Despalillado: consiste en separar las uvas de los raspones, ya que otorgan al vino sabores herbáceos o tánicos no deseados.

C- Estrujado: en esta etapa se produce una leve rotura de los granos de uva. Del estrujado surge una pasta viscosa compuesta de jugo procedente de las pulpas de uvas o mosto, hollejos rotos y pepitas.

D- Sulfitado: es importante la utilización de dióxido de azufre porque es antiséptico y bactericida. Evita fermentaciones espontáneas y facilita la maceración.

E- Escurrido y Prensado: el prensado consiste en presionar la uva estrujada y escurrida. Al finalizar este proceso, en la prensa queda el “orujo” (hollejo y pepitas).

F- Desfangado: es un proceso de limpieza con el cual se realiza la clarificación del mosto. Los fangos están compuestos por residuos terrosos, trozos de raspones y hollejos, proteínas precipitadas y sustancias mucilaginosas. Este paso es muy

recomendado en la elaboración de vinos blancos porque elimina la mayor parte de los componentes que enturbian el mosto recién obtenido, lo que evita la generación de aromas desagradables y la elaboración de vinos turbios.

G- Corrección de acidez: los ácidos son uno de los componentes más importantes del vino porque, en su medida justa, lo protegen de la acción de microorganismos y colaboran al sabor y color. Se emplea el ácido tartárico y cítrico.

H- Fermentación alcohólica: durante la fermentación alcohólica, las levaduras transforman los azúcares (glucosa y fructosa) en alcohol etílico y anhídrido carbónico.

I- Fermentación maloláctica: proceso adicional de la fermentación alcohólica que puede realizarse o no de acuerdo con el estilo de vino que se pretenda elaborar. Este tipo de fermentación es aconsejable si se quiere obtener un vino blanco con toques lácteos, con más cuerpo o densidad. Resulta innecesario si se requiere un vino fresco y frutado. El ácido málico del vino se transforma en ácido láctico gracias al accionar de las bacterias lácticas. Es un fenómeno natural y espontáneo que se experimenta en todos los casos en que los hollejos de las uvas contengan este tipo de bacterias.

J- Clarificación: cuya función principal es obtener un vino límpido y con brillo. Clarificar implica añadir una sustancia que atrape las partículas y las engrose para acelerar su caída. Se utiliza como productos clarificantes albúmina, caseína, tierras de diatomeas, bentonita, alginatos, carbón activo, etc.

K- Estabilización: se lleva a cabo con el objetivo que la claridad del vino se conserve a lo largo del tiempo luego del embotellado. Para ello se implementa procesos físicos y químicos que controlan posibles alteraciones y previenen el nuevo enturbiamiento del vino. Los procedimientos físicos usan el frío, provocando la cristalización y luego una separación. Los procedimientos químicos usan aditivos inhibidores, que imposibilitan alteraciones a largo plazo.

L- Filtración: Consiste en retener en un tamiz o superficie porosa, por el que se hace pasar el vino, esos componentes sólidos que se separaron en el proceso de clarificación.

M- Crianza: El proceso de envejecimiento se realiza en dos fases: oxidativa y reductora. La primera tiene lugar en toneles de madera, donde reducidas cantidades de oxígeno penetran en el interior del recipiente modificando de forma natural la estructura química de muchos de los componentes del vino.

N- Embotellado. Con el traslado del vino a las botellas comienza la fase reductora del proceso de envejecimiento. En la botella no penetra prácticamente oxígeno, por lo que los constituyentes del vino reaccionan entre sí en su ausencia.

1.6.2.2 Composición química del vino.

El proceso de elaboración del vino demuestra que es un alimento muy complejo en cuya composición se encuentran más de mil compuestos químicos diferentes. Desde el punto de vista cuantitativo, el más significativo es el agua, seguido por el alcohol etílico. Dentro de los componentes minoritarios se destacan los ácidos, azúcares y los compuestos polifenólicos; estos últimos como uno de los componentes que más atributos de calidad proporciona al vino (Casares Faulín, 2010).

Agua

Se trata de agua biológica procedente de la uva, es el compuesto más importante en el vino. Sus proporciones varían dependiendo del grado alcohólico, de entre un 75-90% del total.

Alcohol etílico o etanol

Representa entre un 10-15 % de la composición del vino, siendo el segundo componente desde el punto de vista cuantitativo. Surge por la fermentación de los azúcares de la uva, glucosa y fructuosa, ejerciendo como soporte de los componentes aromáticos del vino, de sabor ligeramente dulce.

Glicerol o glicerina

El glicerol o glicerina se genera por la transformación de la glucosa en alcohol obtenida de la fermentación glicéropirúvica, producto secundario de la fermentación alcohólica. Sus concentraciones varían entre 5 y 15 g por litro y contribuye a la consistencia, sedosidad y cuerpo del vino, aportando cierto dulzor.

Otros alcoholes

En concentraciones por debajo de 1 g por litro, se encuentran otros alcoholes como el propanol, metanol, isobutanol, sorbitol y feniletanol, entre otros. Son los encargados de la formación de ésteres que participan en el aroma de los vinos.

Ácidos

Diferenciamos dos grupos en el total de ácidos que componen el vino: La acidez fija que proviene de la uva, ácido tartárico, málico y cítrico, y la acidez proveniente de la fermentación, ácido succínico y láctico. Su existencia asegura la conservación del vino y el cuidado del color, sabor y aromas. La acidez volátil, la componen únicamente ácidos formados en la fermentación, ácido acético, propiónico, butírico y sulfúrico. Es primordial mantener el control de esta acidez volátil por debajo de los parámetros establecidos (menor a 1,2 g ácido acético/ l de vino). Si es elevada, provocaría que el vino acabara picándose o avinagrándose.

Sustancias volátiles y aromáticas

Participan en el origen de los aromas y el bouquet. La mayoría procede de las levaduras y colaboran en la formación de los aromas secundarios y terciarios de los vinos. Actualmente, hay reconocidas alrededor de 500 sustancias como componentes de aroma, y podemos clasificarlos en cuatro grupos principales: alcoholes, ésteres, ácidos, carbonilos y terpenos.

Compuestos Fenólicos

Las máximas concentraciones de compuestos fenólicos, se encuentran en el hollejo y las pepitas. Podemos dividirlos en dos principales grupos: los ácidos fenólicos (benzoicos y cinámicos) y los flavonoides (flavonoles, antocianos y taninos). Son los responsables de proporcionar a los vinos su color, sabor astringente y amargo, cuerpo, suavidad y aromas, condicionando la evolución del vino y participando en su equilibrio. Las diferencias entre un vino blanco y un vino tinto, se deben a estas sustancias.

Sales y Componentes Minerales

El gusto salado se transmite al vino a través de las sales de los ácidos minerales y de algunos ácidos orgánicos. El vino contiene alrededor de 2 a 4 gramos por litro de estas sustancias y fundamentalmente potencia otros sabores y determinadas sensaciones como

el frescor. Sus principales componentes en sales y compuestos minerales son: fosfato, sulfato, cloruro, sulfito, malato, potasio, sodio, magnesio, calcio, hierro, aluminio, cobre, flúor, silicio, yodo, bromo, boro, zinc, etc.

Vitaminas

El vino contiene todas las vitaminas imprescindibles para la vida, actuando como factores indispensables para levaduras y bacterias. Entre las vitaminas hidrosolubles en cantidades pequeñas, encontramos: Tiamina (B1), Riboflavina (B2), Nicotinamida (B3), Ácido Pantoténico (B5), Piridoxina (B6), Mesoinositol (B7), Biotina (B8), Cobalamina (B12), Ácido Fólico (B9), Cianocobalamina (B12) y Ácido ascórbico (vitamina C).

1.6.3 El vino y sus propiedades naturales.

Históricamente el consumo de vino ha sido relacionado con la promoción de la salud y prevención de enfermedades. El vino es la única bebida alcohólica considerada alimento dado que otorga al cuerpo gran cantidad de minerales, vitaminas del complejo B y otros (Gimeno, 2006). Hasta ese momento, parecía que el efecto beneficioso del vino se estaría ejerciendo por la capacidad del alcohol (consumo moderado de 20-30 g/día) para reducir los niveles de colesterol en sangre (Moore & Pearson, 1986). Sin embargo, estudios posteriores observaron efectos diferenciales cuando se compararon distintas bebidas alcohólicas (vino, cerveza, y licores), siendo el vino la que demostró el mayor efecto protector (Criqui & Ringel, 1994; Gronbaek *et al.*, 2000). Fue así, que el efecto beneficioso del vino se asoció a los compuestos polifenólicos, antioxidantes naturales derivados de la uva y que están presentes en el vino (Kinsella *et al.*, 1993). Estos compuestos protegerían contra enfermedades cardiovasculares inhibiendo la oxidación de lípidos celulares (Steinberg, 1993).

La composición polifenólica final de la uva depende de varios factores, como el genotipo, el ambiente y las condiciones de cultivo, que influyen a lo largo de su proceso de desarrollo y maduración. El genotipo determina, por ejemplo, que el hollejo de la uva acumule o no antocianos y, por lo tanto, sea tinta o blanca (Lijavetzky *et al.*, 2006). Por otro lado, el ambiente y las condiciones de cultivo (luz, temperatura, humedad, altitud, tipo de suelo, patógenos) tienen efectos cuantitativos sobre la composición final de estos compuestos. Se ha observado que existen variedades más sensibles que otras a determinadas condiciones ambientales y, por lo tanto, la interacción genotipo-ambiente

también termina repercutiendo en la composición polifenólica final de la uva (Chaves *et al.*, 2010).

Entre estos tres factores, es el genotipo o variedad el que fundamentalmente explica un mayor porcentaje de la variación en la composición polifenólica de las uvas.

1.6.4 Composición fenólica del vino.

Los polifenoles de la uva no están distribuidos homogéneamente en el fruto si no que se concentran principalmente en las semillas (60 %), la piel (30 %), y en un menor grado en la pulpa y tallos (menos de 10 %) (Garrido & Borges, 2013).

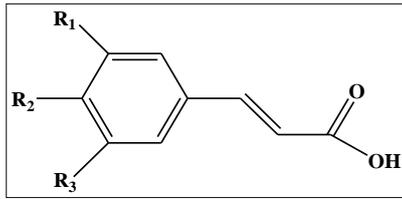
La cantidad y tipo de polifenoles en el vino depende en gran medida del proceso de vinificación, el cual variará dependiendo del producto final a obtener.

Durante la vinificación del vino blanco, el zumo se separa de las partes sólidas inmediatamente después de la molienda de la uva. Por lo que, el contenido de polifenoles será más bajo en el vino blanco, más alto en el vino tinto e intermedio en vinos rosados (Neveu, *et al.*, 2010). En el vino blanco por lo tanto los principales polifenoles presentes son los que aporta la pulpa, ácidos fenólicos, junto con menores cantidades de catequinas y estilbeno (Neveu, *et al.*, 2010).

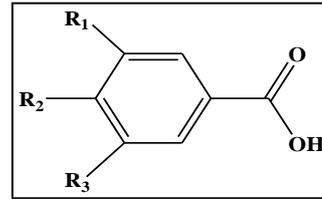
Los compuestos fenólicos que se encuentran principalmente en los vinos blancos son ácidos hidroxicinámicos, ácidos hidroxibenzoico, flavonoles y favanoles. Los compuestos fenólicos son fácilmente oxidados en la presencia de oxígeno debido a sus múltiples grupos hidroxilo en la estructura y es una reacción importante que ocurre durante ambos procesos de fermentación y almacenamiento (Waterhouse y Laurie, 2006).

1.6.4.1 Ácidos fenólicos.

La denominación ácido fenólico se aplica a todos los compuestos orgánicos que poseen como mínimo una función carboxílica y un hidroxilo fenólico (Bruneton, 1993; Figura 1.4). Los ácidos fenólicos existen de forma predominante como ácidos hidroxibenzóicos, que contienen 7 átomos de carbono, e hidroxicinámicos, que contienen 9 átomos de carbono. Ambos están presentes tanto en la uva como en el vino. El vino blanco contiene 2,84 mg de ácidos hidroxicinámicos y 2,49 mg de ácidos hidroxibenzoicos por cada 100 ml de vino.



Ácidos hidroxicinámicos



Ácidos hidroxibenzoicos

Figura 1.4 Estructura química de los ácidos fenólicos.

Como representantes más importantes de ácidos hidroxibenzoicos se pueden citar los ácidos vanílico y gálico (Figura 1.5). Al grupo de ácidos hidroxicinámicos le pertenecen los ácidos p-cumárico, caféico y ferúlico (Neveu *et al.*, 2010; Figura 1.6).

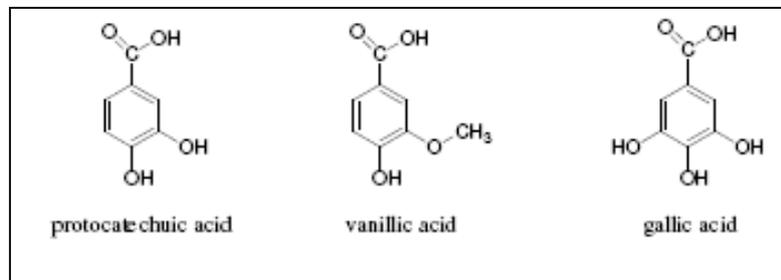


Figura 1.5 Estructura química de los ácidos hidroxibenzoicos.

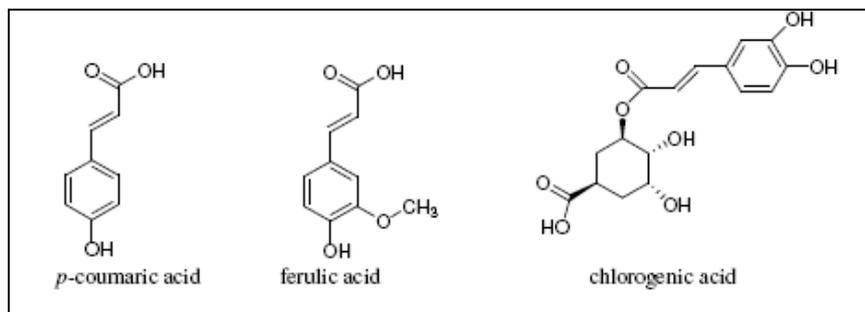


Figura 1.6 Estructura química de los ácidos hidroxicinámicos.

A pesar de que los vinos blancos contienen una baja concentración de compuestos fenólicos comparados con los vinos tintos, estos contienen comparativamente una concentración alta de ácidos hidroxicinámicos. Los ácidos hidroxicinámicos son por tanto la clase predominante de fenoles en los vinos blancos y la clase principal de fenoles no flavonoides en vinos tintos (Vanzo *et al.*, 2007).

1.6.4.2 Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de pigmentos casi universales en el reino vegetal. Son hidrosolubles y los responsables de la coloración de flores, frutos e incluso de las hojas. Existen alrededor de 4000 flavonoides descritos y todos ellos tienen un origen biosintético común. Su estructura deriva de la 2-fenil-cromona (Bruneton, 1993). Los compuestos flavonoides están formados por 15 átomos de carbono que se encuentran constituyendo dos anillos aromáticos unidos entre sí mediante una cadena carbonada de 3 átomos (que puede formar parte de un tercer anillo aromático) (Garrido & Borges, 2013).

Se trata de un grupo de gran diversidad y complejidad química. Dentro del cual, en el caso específico de la uva y el vino, merecen mención especial los flavanoles por su abundancia.

Estos compuestos están presentes en la piel y en las semillas de la uva, así como en el vino. El vino contiene flavanoles, incluyendo proantocianidinas (polímeros) y catequinas (monómeros). Las proantocianidinas y monómeros de flavanoles son particularmente abundantes en el vino tinto y se encuentran en menor proporción en el vino blanco (respectivamente 1,7 y 2,0 mg/100 ml) (Neveu, *et al.*, 2010).

Los principales monómeros de flavanoles son (+)-catequina (1,0 mg/100 ml vino blanco) y su enantiómero la (-)-epicatequina (0,9 mg/100 ml vino blanco).

En los vinos blancos producidos bajo condiciones especiales, evitando un contacto prologando con la piel de las uvas, la catequina resulta ser el flavonoide más abundante, siendo el responsable del sabor característico del vino (Lunte *et al.*, 1988).

Los flavanoles le siguen en importancia, teniendo el vino blanco una concentración de 0,48 mg/100 ml de vino. Los principales flavanoles, en el vino blanco, son quercetina, isorhamnetina y kaempferol (Garrido & Borges, 2013).

1.6.4.3 Estilbenos

Formados por dos anillos aromáticos (bencenos) separados entre sí por un puente etano o eteno. Los estilbenos pueden estar libres o formando heterósidos a veces poliméricos (Bruneton, 1993).

El vino es la fuente dietética principal de resveratrol. Este compuesto se produce en las hojas y en la piel de las uvas en respuesta a una infección o a un estrés inducido por herbicidas, fungicidas o luz UV. El resveratrol se encuentra como aglicón (trans y

cis - resveratrol), o como glucósido (trans y cis - piceído) y en formas diméricas (viniferin y pallidol) (Baur & Sinclair, 2006).

Se sabe que el contenido de resveratrol en la uva disminuye considerablemente durante la maduración del fruto. En el vino, el resveratrol está presente sólo a nivel de trazas, su concentración exacta dependerá altamente de la técnica enológica utilizada en su vinificación (Garrido & Borges, 2013). Valores de contenido de resveratrol y su 3 - O- glucósido son, respectivamente 0,04 y 0,25 mg/100 ml en el vino blanco (Neveu, *et al.*, 2010).

Durante el proceso de vinificación la molécula de resveratrol se isomeriza a trans-resveratrol y por ello este isómero se encuentra en menor concentración en la uva (Neveu, *et al.*, 2010).

1.7 Importancia del estudio.

La calidad nutricional de los alimentos es motivo de permanente atención por parte de los consumidores y profesionales de la alimentación, no solo por el aporte de nutrientes esenciales necesarios para la vida como proteínas, lípidos, hidratos de carbono, vitaminas y minerales, sino también por el aporte de otros compuestos bioactivos, importantes para la promoción de la salud y prevención de enfermedades. Por tal motivo, actualmente son de gran interés las propiedades funcionales de los alimentos, y en particular la acción antioxidante de los mismos por la protección que brindan a los organismos vivos frente al daño oxidativo generado por la sobreproducción de radicales libres en células y tejidos, evitando de ese modo los efectos del deterioro de los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos.

Entre las principales fuentes de antioxidantes naturales exógenos se destaca la uva *Vitis vinifera* L. y su derivado del proceso de vinificación: el vino. Estos productos han recibido gran atención debido a la alta concentración y gran variedad de compuestos polifenólicos, representando importantes fuentes dietarias de numerosos polifenoles potencialmente bioactivos.

El vino es una bebida consumida ampliamente alrededor del mundo. De acuerdo a los últimos datos publicados por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV, 2015), el 80 % del vino en el mundo es producido por 10 países, entre los cuales Argentina ocupa el quinto lugar representando el 6 % de la producción mundial, y además, se destaca por ser el mayor productor de vinos en el hemisferio sur del continente americano (OIV, 2015).

Se sabe que varios factores, incluyendo la variedad de la uva, su grado de maduración, factores ambientales de cultivo y los procedimientos tecnológicos utilizados durante la vinificación, pueden afectar cualitativa y cuantitativamente la composición fenólica de la uva y el vino y, por lo tanto, sus propiedades antioxidantes. Sin embargo, el efecto de los cambios de la composición polifenólica como consecuencia de la vinificación sobre la capacidad antioxidante de dichas matrices no ha sido aún completamente dilucidado. En adición, es muy escaso el conocimiento sobre el efecto de la digestión gastrointestinal sobre el poder antioxidante *in vivo* de las mismas, y los mecanismos de acción a nivel celular involucrados en dicha bioactividad.

Esta situación es indicativa de que la alta actividad vitivinícola, internacional y nacional, necesita ir acompañada del conocimiento científico que apoye la comercialización del vino y, particularmente, nos mantenga en el mercado mundial, por medio de estudios que valoren sus propiedades funcionales.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General:

Evaluar los cambios en el perfil de polifenoles y actividad antioxidante debido al proceso de vinificación de uvas blancas. Estudiar la resistencia química de polifenoles en condiciones que simulan la digestión gastrointestinal.

2.2 Objetivos Específicos:

- ✓ Determinar el contenido total y perfil de polifenoles en muestras de uva y vino blanco.
- ✓ Estudiar la capacidad antioxidante por métodos *in vitro* (FRAP, TEAC, DPPH).
- ✓ Evaluar la resistencia química de polifenoles de uva y vino bajo condiciones que simulan el ambiente del tracto gastrointestinal.
- ✓ Identificar mediante cultivos de células intestinales humanas (Caco-2), probables variaciones de la actividad antioxidante *ex vivo* de polifenoles de uva y vino por la incubación en condiciones que simulan el ambiente gastrointestinal.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Muestras.

Se estudiaron dos variedades de uvas blancas *Vitis vinifera* L. cv. Viognier y Chardonay, y los vinos varietales correspondientes (producto final). Las muestras se obtuvieron de la bodega "Antonio de la Torre" localizada en la provincia de San Juan, Argentina.

En el caso de los vinos, los análisis se llevaron a cabo sobre las muestras tal cual, sin previo procesamiento. Por el contrario, en el caso de las muestras sólidas (uvas) los análisis de compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante *in vitro* y *ex vivo* se llevaron a cabo sobre los extractos polifenólicos correspondientes.

3.2 Extracción de compuestos polifenólicos de uvas.

Para la extracción de los compuestos polifenólicos presentes en uvas se utilizó metanol anhidro (Sintorgan, Argentina) y ácido clorhídrico (J. T. Baker, México) grado analítico.

Metodología.

La extracción de los compuestos polifenólicos de las uvas enteras (previamente seleccionadas y cuidadosamente despalilladas, lavadas con agua y secadas con papel) se llevó a cabo de acuerdo a la metodología propuesta por Poudel *et al.* (2008).

Para la extracción de los compuestos polifenólicos 1,0 g de muestra liofilizada y pulverizada se homogeneizó con 11 mL de metanol acidificado (HCl 0,1 % v/v) utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax T18 (Ika- Labortechnik, Alemania) durante 1 min a 24.000 rpm. El homogenato obtenido se incubó con agitación a 150 rpm por 2 h a 4 °C en un agitador KLINE (VICKING, Argentina). Luego se centrifugaron a 3000-4000 rpm durante 10 min. El sobrenadante obtenido fue separado, y el sedimento sólido re-extraído con 7 mL del solvente de extracción como se describió anteriormente. Las dos fracciones de extractos obtenidas fueron combinadas y almacenadas a -80 °C hasta su análisis. Todo el procedimiento se llevó a cabo protegiendo a las muestras de la luz. Las extracciones se realizaron por triplicado.

3.3 Contenido de Polifenoles Totales- Técnica de Folin-Ciocalteu.

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton & Rossi (1965). El mecanismo básico del ensayo involucra una reacción redox. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico que actúan como oxidantes, por lo que se reducen en presencia de los compuestos polifenólicos presentes en las muestras a ensayar. Los ácidos reducidos a óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}) poseen un máximo de absorbancia a 750 nm.

Procedimiento. Para la determinación del contenido de polifenoles totales (PT) se colocaron 1,680 μ L de agua ultra pura y 90 μ L de metanol en un tubo de Khan, se añadieron 20 μ L de muestra y luego se agregaron 100 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu. La mezcla obtenida se agitó en un vortex (Decalab, Argentina). Luego de exactamente 1 min, se agregaron 300 μ L de Na_2CO_3 al 20 % p/v y se agitó nuevamente. La mezcla se incubó 120 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente se midió la absorbancia de la solución a 750 nm contra un blanco de reactivo procesado de la misma forma. Todas las muestras y los blancos fueron determinados por triplicado.

Para calcular el contenido de polifenoles totales (PT) en las muestras, se construyó una curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar. El rango de linealidad utilizado fue de 0,25 a 5,00 mg de ácido gálico/ L. Los estándares se procesaron por triplicado de la misma forma que las muestras.

Los resultados obtenidos para los extractos de uva se expresaron como miligramos de polifenoles equivalentes al ácido gálico en 1kg de peso fresco de muestra (mg AG/ kg). En el caso de los vinos, los resultados se informaron como miligramos de polifenoles equivalentes al ácido gálico en 1 L de muestra (mg AG/ L).

3.4 Perfil de polifenoles por HPLC-MS/MS.

El perfil de compuestos polifenólicos en las muestras en estudio se determinó mediante HPLC-DAD-ESI-MS/MS.

El HPLC utilizado fue un Agilent Technology Serie1200, equipado con una bomba de gradiente binario Agilent G1312B SL, un degasificador de solventes Agilent G1379B y un inyector automático Agilent G1367 D SL+WP.

La separación cromatográfica de los compuestos polifenólicos presentes en las muestras se realizó en una columna LUNA (Phenomenex, Torrance, CA, USA) de fase reversa C18 (5 μ m, 250 mm \times 4,60 mm de diámetro interno) a 35 °C utilizando el módulo de calentamiento Agilent G1316 B. La separación de los compuestos se llevó a

cabo utilizando ácido fórmico al 0,5 % v/v en agua como solvente A, y ácido fórmico al 0,5 % v/v en metanol como solvente B. El flujo utilizado de la fase móvil para la separación de los compuestos fue de 0,4 mL/ min y el volumen de inyección de muestra fue de 40 μ L.

El sistema de HPLC se acopló a un detector con arreglo de diodos (DAD) Agilent G1315 C Starlight DAD, seguido de un espectrómetro de masas QTOF (micrOTOF Serie QII de Bruker) equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI).

Los espectros UV-VIS se registraron entre 200 y 600 nm. Los espectros de masas se registraron en un intervalo de 80 a 1500 m/z en modo positivo, para el análisis de antocianos, y en modo negativo, para el análisis de flavonoles, flavanoles, ácidos fenólicos y estilbenos. Las condiciones de trabajo de la fuente de ionización ESI fueron las siguientes: voltaje del capilar, 4500 V; presión del gas de nebulización, 4,0 bar; flujo del gas de secado, 8,0 L/ min; y temperatura del gas de secado, 180 °C. Como gas de nebulización se utilizó N₂, mientras que el gas de colisión fue Ar. El detector de masas se programó para realizar un barrido de MS/MS de los 3 iones más abundantes, utilizando una energía de colisión de 13,0 eV. La adquisición de datos se realizó utilizando el programa Compass Versión 3.1 y el procesamiento de los mismos se llevó a cabo con el programa DataAnalysis Versión 4.0 (BrukerDaltonics, USA).

La optimización del método de análisis se realizó utilizando estándares comerciales representando distintas familias de compuestos polifenólicos.

Los compuestos polifenólicos presentes en las muestras en estudio se identificaron de acuerdo a sus tiempos de retención, espectros UV-VIS, masa exacta, espectros de MS y MS/MS, como así también por comparación con estándares comerciales y con compuestos descritos en la literatura.

La cuantificación de los compuestos identificados en las muestras se realizó utilizando el área del pico obtenido del cromatograma del ión extraído, mediante curvas de calibración externas de estándares polifenólicos disponibles. Para esto, se preparó una solución madre multi-componentes en metanol conteniendo quercetina, kaempferol, (+)-catequina y ácido cafeico, cada uno en concentración de 100 mg/ L. Las curvas de calibración para cada compuesto se prepararon por diluciones apropiadas de dicha solución madre. Cuando no se contó con el estándar comercial de un compuesto identificado, su cuantificación se realizó a partir de un estándar con estructura similar. Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se evaluaron experimentalmente

considerando una relación señal/ruido de 3 y 10 respectivamente. Los LD y LC fueron los siguientes: quercetina = 0,012 y 0,004 mg/ L; kaempferol = 0,011y 0,003 mg/ L; (+)-catequina = 0,018 y 0,005 mg/ L; ácido cafeico= 0,1 y 0,03 mg/ L. La precisión del método se evaluó mediante el cálculo de los coeficientes de variación (CV) de un mínimo de nueve determinaciones que cubren el rango necesario de concentraciones. El CV estuvo por debajo del 13%. Todas las muestras en estudio, apropiadamente diluidas, y las soluciones estándares se filtraron a través de membranas de 0,45 µm de diámetro de poro y se inyectaron por triplicado.

3.5 Análisis de Capacidad Antioxidante *in vitro*.

La capacidad antioxidante (CA) *in vitro* se midió a través de los ensayos FRAP, que mide el poder reductor de una muestra, y ABTS y DPPH, que evalúan la capacidad de captación de radicales libres. Los resultados en todos los casos se expresaron en relación a la capacidad antioxidante del Trolox, un análogo hidrosoluble de la vitamina E de reconocida actividad antioxidante.

3.5.1 Ensayo FRAP.

El método FRAP (poder antioxidante de reducción del ión férrico), introducido por Benzie & Strain (1996) para medir la capacidad antioxidante total en plasma, se basa en la capacidad para reducir, por transferencia electrónica, el ión férrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}) en medio acuoso ácido (pH = 3,6). Para cuantificar este poder reductor se utiliza una reacción colorimétrica por agregado de TPTZ (2,4,6,-tripiridil-s-triazina) que bajo estas condiciones forma un complejo coloreado con el Fe^{2+} con un máximo de absorbancia a 593 nm. Este método no detecta compuestos que actúan por transferencia de hidrógeno, particularmente tioles y proteínas (Prior *et al.*, 2005). La reacción que tiene lugar en este ensayo es pH dependiente y el aumento de la concentración de Fe^{2+} -TPTZ es linealmente dependiente de la concentración de antioxidantes presentes en la muestra.

Procedimiento. La metodología utilizada para este ensayo fue la descrita por Benzie & Strain (1996) con algunas modificaciones. Diariamente se preparó el reactivo de trabajo, que consiste en una mezcla de buffer acetato 300 mM ($NaC_2H_3O_2 - C_2H_4O_2$ a pH = 3,6), TPTZ 10 mM en HCl 40 mM y tricloruro férrico ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) 20 mM en una proporción 10:1:1.

Para la determinación de las muestras se colocaron 3 mL de reactivo de trabajo en un tubo de Khan y se añadieron 100 μ L de muestra apropiadamente diluida. La mezcla obtenida se agitó en un vortex (Decalab, Argentina). Luego de 6 min de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se leyó la absorbancia de la solución a 593 nm (A_1) contra un blanco procesado de la misma forma (A_0), en el cual la muestra fue reemplazada por el solvente de dilución. Todas las muestras y los blancos fueron determinados por duplicado y se calculó la absorbancia de cada muestra a través de la diferencia (Δ Abs) de $A_1 - A_0$.

El poder reductor de cada muestra se determinó extrapolando su Δ Abs en una curva de calibración construida utilizando trolox como antioxidante. Esta curva de calibración se preparó diariamente. El rango de linealidad utilizado fue de 0,001 a 0,020 mM. Los estándares se procesaron por triplicado de la misma forma que las muestras.

Los resultados obtenidos para los extractos de uva se expresaron como mmol equivalentes de trolox por kg de peso fresco de muestra (mmol Trolox / kg). En el caso de los vinos, los resultados se informaron como mmol equivalentes de trolox en 1 L de muestra (mmol trolox / L).

3.5.2 Ensayo ABTS.

Este ensayo mide la capacidad de un compuesto para captar el radical catión coloreado 2,2'-azino-bis(3-etilenbenzotiazolin-6-sulfónico) ($ABTS^{\bullet+}$), convirtiéndolo a un producto sin color (Arts *et al.*, 2003). Este radical tiene un espectro de absorción característico, con máximos a 414, 645, 734 y 815 nm y posee una coloración verde-azulada. Químicamente es muy estable y soluble en medio acuoso y etanólico, permitiendo el estudio de antioxidantes tanto hidrosolubles como liposolubles. La reacción es independiente del pH y la disminución de la concentración de $ABTS^{\bullet+}$ es linealmente dependiente de la concentración de antioxidantes presentes en la muestra (Prior *et al.*, 2005).

Procedimiento. La metodología utilizada en este trabajo es una variante del método original, propuesta por Re *et al.* (1999), en la que el $ABTS^{\bullet+}$ se genera directamente a través de la reacción con persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$).

El $ABTS^{\bullet+}$ se preparó diariamente mezclando 5 mL de una solución de ABTS 7 mM en agua ultra pura, con 3,5 mg de $K_2S_2O_8$. A esta solución se la protegió de la luz y se la dejó estabilizar durante 12-16 h a temperatura ambiente. El reactivo de trabajo se

preparó diluyendo el ABTS^{•+} generado con metanol hasta una absorbancia de $0,80 \pm 0,02$, a una longitud de onda de 734 nm y a una temperatura de 25 °C.

Para la determinación de las muestras se colocaron 3 mL de reactivo de trabajo en un tubo de Khan y se añadieron 100 µL de muestra apropiadamente diluida. La mezcla obtenida se agitó en un vortex (Decalab, Argentina). Luego de 4 min de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se leyó la absorbancia de la solución a 734 nm (A_1) contra un blanco procesado de la misma forma (A_0), en el cual la muestra fue reemplazada por el solvente de dilución. Todas las muestras y los blancos se ensayaron por duplicado y se calculó la absorbancia de cada muestra a través de la diferencia (ΔAbs) de $A_0 - A_1$.

La capacidad de captación de radicales libres de cada muestra se determinó extrapolando su ΔAbs en una curva de calibración construida utilizando trolox como antioxidante. Esta curva de calibración se preparó diariamente. El rango de linealidad utilizado fue de 0,001 a 0,020 mM. Los estándares se procesaron por triplicado de la misma forma que las muestras.

Los resultados obtenidos para los extractos de uva se expresaron como mmol equivalentes de trolox por kg de peso fresco de muestra (mmol Trolox / kg). En el caso de los vinos, los resultados se informaron como mmol equivalentes de trolox en 1 L de muestra (mmol trolox / L).

3.5.3 Ensayo DPPH.

Este ensayo mide la capacidad para captar radicales libres por medio de la capacidad que presentan los compuestos antioxidantes para atrapar el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]), convirtiéndolo a un producto sin color (Brand-Williams *et al.*, 1995). El DPPH[•] es uno de los pocos radicales orgánicos nitrogenados estables y disponibles comercialmente, por lo que no requiere ser generado previo al ensayo. Este radical tiene un espectro de absorción característico, con un máximo a 515 nm, y posee una coloración púrpura intensa (Prior *et al.*, 2005). Es muy soluble en medio orgánico, sin embargo soluciones conteniendo hasta un 50 % de agua permiten utilizarlo para medir la capacidad antioxidantes tanto de compuestos liposolubles como hidrosolubles (Stasko *et al.*, 2007). La reacción que tiene lugar en este ensayo es dependiente del pH (Foti *et al.*, 2004) y la disminución de la concentración del DPPH[•] es directamente proporcional a la concentración de antioxidantes presentes en la muestra (Prior *et al.*, 2005).

Procedimiento. La metodología utilizada para este ensayo fue la descrita por Brand-Williams *et al.*, (1995). Diariamente se preparó el reactivo de trabajo que consiste en una solución 60 μM del DPPH^{*} en metanol protegida de la luz.

Para la determinación de las muestras se colocaron 3 mL de reactivo de trabajo en un tubo de Khan y se añadieron 100 μL de muestra apropiadamente diluida. La mezcla obtenida se agitó en un vortex (Decalab, Argentina). Luego de 15 min de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se leyó la absorbancia de la solución a 515 nm (A_1) contra un blanco procesado de la misma forma (A_0), en el cual la muestra fue reemplazada por el solvente de dilución. Todas las muestras y los blancos fueron determinados por triplicado y se calculó la absorbancia de cada muestra a través de la diferencia (ΔAbs) de $A_0 - A_1$.

La capacidad de captación de radicales libres de cada muestra se determinó extrapolando su ΔAbs en una curva de calibración construida utilizando trolox como antioxidante. Esta curva de calibración se preparó diariamente. El rango de linealidad utilizado fue de 0,001 a 0,020 mM. Los estándares se procesaron por triplicado de la misma forma que las muestras.

Los resultados obtenidos para los extractos de uva se expresaron como mmol equivalentes de trolox por kg de peso fresco de muestra (mmol Trolox / kg). En el caso de los vinos, los resultados se informaron como mmol equivalentes de trolox en 1 L de muestra (mmol trolox / L).

3.6 Digestión gastro-intestinal simulada

La evaluación de la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos polifenólicos presentes en alimentos como la uva y el vino de las variedades Chardonay, Viognier, se realizó mediante un ensayo de digestión gastro-intestinal *in vitro*.

La metodología empleada para llevar a cabo el ensayo se basó en los trabajos publicados por Hu *et al.* (2013), Mc Dougall *et al.* (2005) y Tagliazucchi *et al.* (2010) con algunas modificaciones. El procedimiento se realizó en 3 etapas: la primera para simular el proceso de digestión en la boca, la segunda para simular el proceso de digestión en el estómago (digestión gástrica), y la última para imitar la digestión y la absorción de los compuestos polifenólicos en el intestino delgado (digestión en el duodeno). Los dos tipos de alimentos evaluados (uvas y vino) se procesaron por triplicado y cada una de estas réplicas fue muestreada al final de cada etapa del ensayo.

Procedimiento.

1° Digestión Bucal. Esta etapa se realizó utilizando saliva humana recolectada según Hu *et al.* (2013). Dos g de uva (peso fresco del alimento) o 4 mL de vino se colocaron en un tubo plástico Falcon de 15 mL, al cual se agregaron 2 mL de saliva humana recién recolectada. Para simular la masticación, se homogeneizó la mezcla durante 30 s a 24.000 rpm en un homogeneizador Ultra-Turrax T18 (Ika- Labortechnik, Alemania); finalmente se agregaron 2 mL de agua ultra pura lavando el vástago del homogeneizador. Inmediatamente se ajustó el pH a 2 con 30 μ L de HCl 6 M para detener la acción de la enzima amilasa, acondicionando el medio para continuar con la digestión gástrica.

2° Digestión Gástrica. Al homogenato obtenido de la digestión bucal se le agregó la solución de pepsina a concentración final de 450 unidades de pepsina/ g de uva o mL de vino digerido a partir de una solución de pepsina (40 mg de pepsina en 1 mL de HCl 0,1 M), y se lo incubó en oscuridad con agitación durante 2 h a 37 °C para simular la digestión en el estómago.

3° Digestión y Absorción Intestinal. Al homogenato proveniente de la digestión en el estómago se agregaron 1,2 mg de pancreatina y 5,6 mg de sales biliares por g de uva o mL de vino digerido a partir de una solución intestinal de pancreatina/sales biliares (5 mg de pancreatina más 25 mg de sales biliares en 1 mL de NaHCO₃ 0,1 M, pH = 7,5). La mezcla obtenida se colocó dentro de un segmento de membrana de diálisis (SnakeSkin[®], 10 KDa), el cual permitió simular la absorción de los compuestos polifenólicos a través de la membrana del intestino delgado. El segmento de diálisis perfectamente cerrado se colocó dentro de un frasco de vidrio de 100 mL, conteniendo 25 mL/ g de uva digerida o de vino digerido de una solución de NaHCO₃ 0,1 M, pH = 7,5. La bolsa completamente sumergida se dejó dializar en oscuridad con agitación durante 2 h a 37 °C.

Finalizado el ensayo, por cada tipo de alimento evaluado, uvas y vino, se obtuvieron 4 submuestras: la primera obtenida una vez finalizada la etapa de digestión bucal (denominada Boca); la segunda al concluir la digestión gástrica (denominada Gástrico); y las dos restantes obtenidas luego de la digestión intestinal, (submuestras Dializable y No Dializable). La muestra No dializable está constituida por el homogenato presente en el interior de la membrana de diálisis, mientras que la muestra Dializable corresponde a la solución presente fuera de la membrana de diálisis.

Las submuestras Boca, Gástrico y No dializable recolectadas se centrifugaron a 13.000 x g durante 10 min, y las submuestras No dializable y Dializable se acidificaron con ácido fórmico hasta pH = 2, para neutralizar el NaHCO₃. Inmediatamente, todas las submuestras se filtraron por filtros de 0,45 µm de diámetro de poro, se fraccionaron en microtubos de 1,5 mL y se almacenaron a -80 °C hasta análisis.

3.7. Análisis de la Capacidad Antioxidante en células Caco-2:

Se evaluaron las actividades antioxidantes *ex vivo* de las muestras de vino, uva y del digerido obtenido luego de la simulación gástrica intestinal, ya que los compuestos allí presentes serían los que efectivamente estarían alcanzando las células para cumplir su bioactividad. Como controles se utilizaron las soluciones de digestión (las cuales se incluyeron para determinar el 100 % de viabilidad, es decir “ausencia” de citotoxicidad).

Las actividades antioxidantes total y “biodisponible” fueron evaluadas en el contenido de las bolsas de diálisis (No dializable), y en la solución de diálisis (Dializable). Las células intestinales Caco-2 se incubaron con las uvas/vino/digeridos Dializable y No dializable (2 h), y luego se realizó un tratamiento oxidante. Los % de prevención de citotoxicidad inducida por el oxidante fueron considerados como índices de las actividades antioxidantes de las muestras (20 ng de PT por mL de medio de cultivo, en todos los casos).

3.7.1 Estandarización de cultivos celulares y estrés oxidativo

Los cultivos celulares se realizaron sembrando 10.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos y se cultivaron a 37°C y 5 % CO₂.

En nuestro trabajo el agente oxidante seleccionado fue el H₂O₂, el cual produce daño celular a través de la generación de radicales hidroxilos (HO[•]), una de las especies más reactiva y tóxica para las células. En una primera etapa se estandarizó el estrés oxidativo mediado por H₂O₂, para ser utilizado luego en los ensayos de evaluación de las actividades antioxidantes de los extractos de polifenoles. A tales efectos, se realizaron experimentos para elegir una concentración de H₂O₂, en la que se observe su efecto oxidante y que a la vez no indujera citotoxicidad mayor a 40 % en una hora de cultivo. Para estos experimentos, se cultivaron 10.000 células por pocillo durante 48 horas en las condiciones descritas anteriormente, y luego las células fueron tratadas por una hora con 1; 2; 3,9; 7,8; 15,6; 31,3; 62,5; 125; y 250 mM de H₂O₂. El 100 % de

viabilidad celular fue determinado a partir de pocillos en los que las células fueron cultivadas sólo con el medio de cultivo (DMEM).

3.7.2 Evaluación de la citotoxicidad y capacidad antioxidante *ex vivo* de extractos de polifenoles.

Para evaluar los efectos biológicos de una sustancia o mezcla de compuestos, es necesario confirmar previamente que los mismos no inducen la muerte de las células en las condiciones experimentales utilizadas. Por lo que inicialmente se estudió la citotoxicidad inducida por los diferentes extractos de polifenoles disueltos en DMSO 1 % (vehículo). En estos experimentos, las células fueron cultivadas por 24 horas en DMEM completo, y luego se incubaron por otras 24 horas con los extractos de polifenoles (20 ng de PFs totales por mL de medio de cultivo, en todos los casos). La citotoxicidad del vehículo fue evaluada de la misma manera, pero reemplazando los extractos de polifenoles por DMSO 1 % en DMEM. El 100 % de viabilidad fue determinado a partir de pocillos en los que las células fueron cultivadas sólo con el medio de cultivo (DMEM).

En una etapa posterior se evaluaron las capacidades antioxidantes de los extractos de uvas, vinos, y digeridos. Las células fueron tratadas de la misma manera que se realizó para determinar los efectos citotóxicos de los extractos de polifenoles, y posteriormente se indujo estrés oxidativo durante una hora con una solución de H₂O₂. Además, se evaluaron los efectos del vehículo (DMSO 1 %) sobre la citotoxicidad causada por el tratamiento con H₂O₂, en comparación con la inducida en células cultivadas solo con DMEN completo (Control)

El 100 % de viabilidad fue determinado a partir de pocillos en los que las células fueron cultivadas sólo con el medio de cultivo (sin ningún tratamiento).

3.7.3 Ensayo del MTT

En todos los experimentos, las viabilidades de células sometidas a los diferentes tratamientos fueron evaluadas mediante el ensayo del MTT (Morgan, 1998).

Muchos ensayos biológicos, incluyendo los realizados en este trabajo de tesis, requieren medir la supervivencia y/o proliferación de las células de mamífero. Para esto se utilizó un ensayo colorimétrico rápido, versátil y cuantitativo, basado en una sal de tetrazolio MTT (metiltiazol tetrazolio) ó (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolio

bromuro) cuyo producto final (formazán) puede cuantificarse espectrofotométricamente leyendo la absorbancia entre 540–570 nm (Mosmann, 1983).

Las células, sometidas a todos los tratamientos descritos anteriormente, se lavaron con buffer de fosfatos (PBS), y se incubaron por una hora con una solución de MTT 0,5 mg/mL en medio DMEM suplementado. Finalizada la incubación, las células se volvieron a lavar con buffer PBS. El formazán se solubilizó con 100 microlitros de DMSO por pocillo, determinando luego las absorbancias a 595 nm en un lector de microplacas (Bio-Rad Laboratories, Modelo 680, USA). En cada experimento, se asignó el 100 % de viabilidad a las células cultivadas con DMEM (sin Polifenoles y sin H₂O₂). Luego, el % de viabilidad para cada tratamiento se calculó de la siguiente manera: $\text{Abs Tratamiento} / \text{Abs DMEM} \times 100$. Viabilidad y citotoxicidad se relacionan de la siguiente manera: $\text{Viabilidad (\%)} + \text{Citotoxicidad (\%)} = 100 \%$.

3.8 Obtención de imágenes microscópicas de células Caco-2

Se obtuvieron imágenes de los siguientes tratamientos: cultivo con DMEM completo, tratamiento con la solución oxidante de H₂O₂, y en la incubación con MTT (tiempos: 0 y 60 minutos). Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía de campo claro, en un microscopio invertido digital Leica, modelo DMI 8, acoplado a una cámara digital Leica DFC345 FX (monocromática, a los fines de conseguir mayor sensibilidad en comparación a las imágenes que obtendría una cámara fotográfica a color), y software Leica LAS X CORE. La magnificación fue de 200x, en todos los casos.

3.9 Análisis estadísticos de los datos.

El análisis estadístico de los datos generados en esta tesis se realizó mediante la utilización del programa InfoStat (versión 2014p).

3.9.1 Estadística Descriptiva.

Los datos registrados en un proceso de medición son tratados, en un primer momento, con el objetivo de describir y resumir sus características más sobresalientes. Esto se conoce como *Estadística Descriptiva* y generalmente se basa en la obtención de medidas resumen como la media, la varianza, la desviación estándar, los valores máximos y mínimos, entre otros.

En esta tesis todos los valores obtenidos en las diferentes determinaciones analíticas son expresados como la media \pm desviación estándar.

3.9.2 Estadística Inductiva- Análisis de la Varianza (ANOVA).

El ANOVA es una de las herramientas de inferencia estadística, o estadística inductiva, que permite comparar simultáneamente varias medias (procedentes de distintos grupos de muestra) para establecer si son todas iguales, o si al menos una de ellas es distinta de las demás, con lo cual el o los grupos asociados a dichas medias podrán diferenciarse.

El ANOVA se aplicó a los valores obtenidos en todos los ensayos realizados en esta tesis a fin de evaluar la variación entre variedades y entre tipo de muestras. En todos los casos, cuando el ANOVA indicó diferencias significativas ($p < 0,05$), la comparación de los valores medios de a pares se realizó empleando el método de comparaciones múltiples DGC.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Contenido de Polifenoles en uva y vino blanco.

En el presente estudio se analizaron muestras de extracto de uva y de vino provenientes de dos variedades blancas Chardonnay y Viognier. A los cuales se les determinó contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante total por los métodos FRAP, TEAC, DPPH y ensayos *ex vivo* con cultivo celular.

4.1.1 Contenido de Polifenoles Totales (PT).

El contenido de PT en las uvas varió entre 2178 y 2935 mg ácido gálico / kg de uva fresca. Como se muestra en la Figura 4.1, el contenido de polifenoles totales varía significativamente en las uvas, siendo la variedad Chardonnay la de mayor contenido.

Los valores de PT obtenidos para las uvas estuvieron en línea con valores descritos por otros autores para uva blanca (Derradji-Benmeziane *et al.*, 2014; Franco-Bañuelos *et al.*, 2017) y para otras frutas como moras y fresas (Zapata *et al.*, 2014).

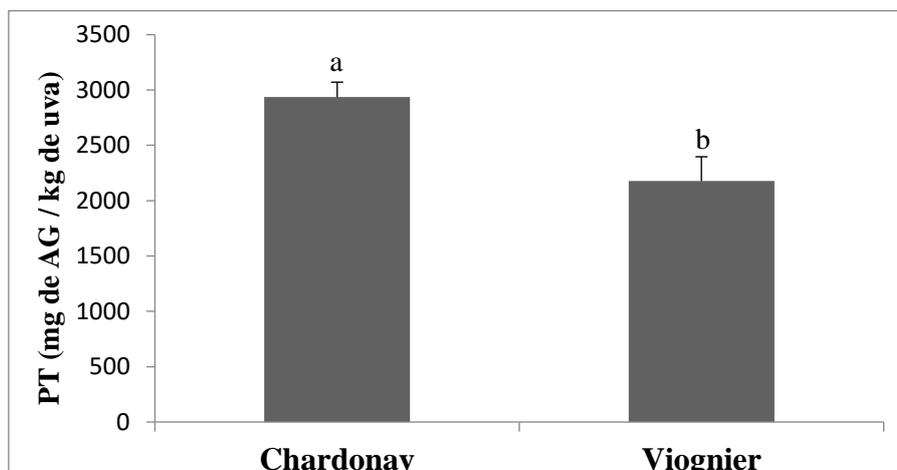


Figura 4.1 Contenido de polifenoles totales en muestras de uva blanca.

Diferentes letras indican diferencia significativa ($p < 0,05$) entre variedades.

En los vinos blancos el contenido de polifenoles totales varió entre 364 - 389 mg de ácido gálico/ L vino; no habiendo diferencias significativas entre variedades (Figura 4.2). Estos valores concuerdan con los informados por otros autores para vinos blancos de diferentes variedades (Korenika *et al.*, 2014; Mitic *et al.*, 2010).

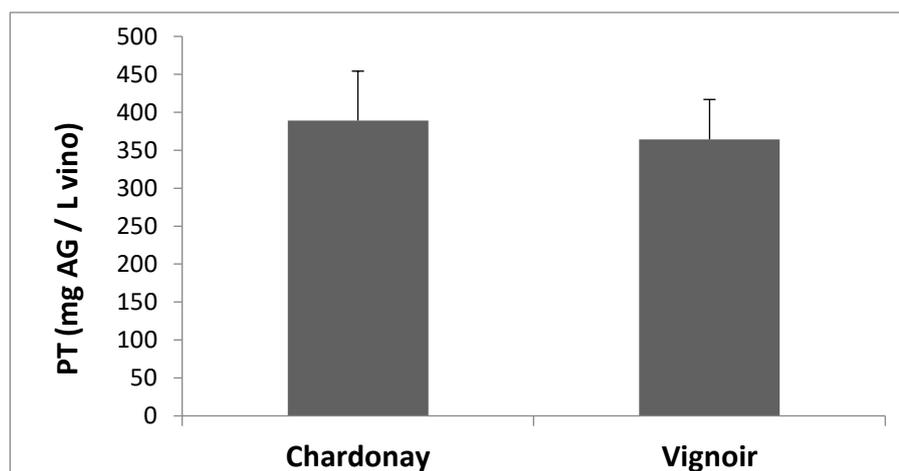


Figura 4.2 Contenido de polifenoles totales en muestras de vino blanco.

De acuerdo a los resultados obtenidos, para la uva se puede observar que existe una diferencia significativa entre variedades, siendo la uva Chardonay la de mayor valor. En cuanto al vino, no existe diferencia significativa entre variedades, y además se observa que el contenido de polifenoles totales en el vino disminuye notablemente con respecto a las uvas. Considerando que en el viñedo se necesitan 1,3 Kg de uva para producir 1 L de vino, nuestros resultados estarían indicando que, en promedio entre las variedades, solo el 12 % de los PT de la uva se encontraron en el vino. Se sabe que los antioxidantes naturales contenidos en los alimentos se pierden significativamente durante la producción del mismo (Baiano *et al.*, 2009; Hirawan *et al.*, 2010; Verardo *et al.*, 2011) ya que depende también del proceso de vinificación utilizado, de la temperatura de vinificación, del tiempo de contacto del mosto, es decir del jugo, con la piel y las pepitas, de las prácticas de remontaje y mezclado que se usaron durante la vinificación, de la concentración de alcohol, del pH y del procedimiento de prensado de la uva (Urquiaga, 2002).

4.2 Identificación de compuestos polifenólicos por HPLC-DAD-ESI-QTOF.

La identificación de los compuestos polifenólicos presentes en las diferentes muestras estudiadas se realizó de acuerdo a la metodología descrita en la **Sección 3.4**. La identificación de los compuestos en cada tipo de muestra se realizó a partir de una mezcla en partes iguales de las dos variedades en estudio.

Un total de 17 compuestos pertenecientes a las familias de flavonoles, flavanoles, ácidos hidroxicinámicos (AHC) e hidroxibenzoicos (AHB) fueron identificados teniendo en cuenta: tiempos de retención, espectros UV-VIS, masa exacta, espectros de MS y MS/MS, comparados a su vez con compuestos descritos en la literatura y con estándares de referencia (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Datos cromatográficos y espectrales de los compuestos polifenólicos identificados en muestras de uva y vino blanco.

Orden Elución	Compuesto	Familia Fenólica	t _r (min)	Fórmula Molecular	[M-H] ⁻ (m/z) experimental	[M-H] ⁻ (m/z) calculada	Error (ppm)	MS/MS (m/z)
1	Ácido Gálico	AHB	11,0	C ₇ H ₅ O ₅	169,0148	169,0142	-3,0	125
2	Ácido Gálico-glc	AHB	11,4	C ₁₃ H ₁₅ O ₁₀	331,0668	331,0671	0,8	169
3	Ácido Caftárico	AHC	12,2	C ₁₃ H ₁₁ O ₉	311,0428	311,0409	6,9	179; 149
4	(+)-Catequina	Flavanol	12,3	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	289,0741	289,0718	8,1	245
5	(-)-Epicatequina	Flavanol	13,1	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	289,0728	289,0718	3,5	245
6	Ácido Coutárico	AHC	13,1	C ₁₃ H ₁₁ O ₈	295,0469	295,0459	3,2	163; 149
7	Ácido Fertárico	AHC	13,3	C ₁₄ H ₁₃ O ₉	325,0594	325,0565	-10,5	193
8	(-)-Epicatequin-3-O-galato	Flavanol	13,6	C ₂₂ H ₁₇ O ₁₀	441,0864	441,0827	8,4	289; 169
9	Ácido Cafeico	AHC	14,6	C ₉ H ₇ O ₄	179,0364	179,0350	-8,0	135
10	Etil galato	AHB	16,6	C ₉ H ₉ O ₅	197,0462	197,0455	-3,1	169
11	Astilbina	Flavonol	18,2	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449,1097	449,1089	-1,7	303; 285
12	Quer-3-glcr	Flavonol	18,5	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃	477,0685	477,0675	-2,3	301
13	Isoquercetina	Flavonol	18,9	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	463,0912	463,0882	-6,4	301
14	Kp-3-glc	Flavonol	21,0	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	447,0945	447,0933	2,7	285
15	Isorh-3-glc	Flavonol	21,1	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂	477,1047	477,1038	-1,8	314; 271
16	Quercetina	Flavonol	24,0	C ₁₅ H ₉ O ₇	301,0347	301,0354	-2,3	179; 151
17	Kaempferol	Flavonol	26,8	C ₁₅ H ₉ O ₆	285,0393	285,0405	4,2	257

Abreviaturas: t_r, tiempo de retención; [M-H]⁻, ión molecular; Quer, quercetina; Kp, kaempferol; Isorh, isorhamnetina; glc, glucósido; glcr, glucurónido; AHB, ácido hidroxibenzoico; AHC, ácido hidroxicinámico.

4.2.1 Flavonoles

De los 17 compuestos identificados, 7 fueron flavonoles. Estos compuestos en la naturaleza se encuentran principalmente unidos a un azúcar, mientras que sus respectivas agliconas pueden derivar por ejemplo del procesamiento de los alimentos. En *V. vinífera* L. la glicosilación de los flavonoles ocurre exclusivamente por esterificación en la posición 3 del anillo C (Castillo-Muñoz *et al.*, 2007).

Con respecto a los compuestos **11**, **12** y **13** fueron identificados como derivados de quercetina. En el primer caso, el compuesto **11** con m/z de 449, el patrón de fragmentación dio lugar al [M-H-164]⁻, derivado de la pérdida de una ramnosa como azúcar sustituyente. El análisis de esta información permitió identificar al compuesto como astilbina o dihydroquercetina-3-O-ramnósido. La fragmentación del compuesto **12** (m/z 477) dio lugar entre su patrón de fragmentación a los iones [M-H-176]⁻. En *V. vinífera* L. la glucosa es el azúcar que generalmente esterifica en C3, sin embargo el ácido glucurónico también ha sido encontrado por esterificar en esta posición (Castillo-Muñoz *et al.*, 2007). En este sentido, la formación de iones [M-H-176]⁻ se asoció a la pérdida de ácido glucurónico como azúcar sustituyente, y los compuestos se identificaron como miricetina-3-O-glucurónico y quercetina-3-O-glucurónico, respectivamente (Castillo-Muñoz *et al.*, 2009). Por su parte, la fragmentación del compuesto **13** (m/z 463) dio lugar al ion con m/z, sugiriendo la pérdida de una glucosa ([M-H-162]⁻). Esta información permitió identificar al compuesto **13** como isoquercetina (o quercetina-3-O-glucósido). La identificación del compuesto **13** fue confirmada por comparación con el tiempo de retención y características espectrales (UV-VIS, MS y MS/MS) del correspondiente estándar bajo idénticas condiciones analíticas.

Los compuestos **16** y **17** presentaron un ion precursor de m/z 301 y 285, respectivamente. Estos iones correspondieron a las agliconas quercetina y kaempferol, respectivamente y fueron identificados por comparación con el tiempo de retención y características espectrales (UV-VIS, MS y MS/MS) de sus correspondientes estándares bajo idénticas condiciones analíticas.

La fragmentación de los compuestos **14** y **15** (m/z 447 y 477 respectivamente), dio lugar a la pérdida de 163 unidades de masa siendo indicativo de la pérdida de una hexosa en el C3 del anillo C de este tipo de compuestos (Ablajan *et al.*, 2006) lo que

permitió identificar a los iones moleculares como 3-O-glucósidos de kaempferol e isorhamnetina, respectivamente (Downey & Rochfort, 2008).

4.2.2 Flavanoles.

De acuerdo a la **Tabla 4.1**, se identificaron 3 flavanoles en las muestras analizadas. Los compuestos **4** y **5** solamente se diferenciaron en el orden de elución. Ambos mostraron el mismo ion molecular, de m/z 289, y dieron lugar al mismo ion fragmento, m/z 245. El ion fragmento $[M-H-44]^-$ en esta clase de compuestos ha sido asignado a la pérdida de un grupo $(CH)_2OH$ (Pérez-Magariño *et al.*, 1999). De acuerdo a los datos analizados, estos compuestos se identificaron como (+)-catequina y (-)-epicatequina, respectivamente. Asimismo, la identificación de ambos fue confirmada por comparación con el tiempo de retención y características espectrales (UV-VIS, MS y MS/MS) de los correspondientes estándares bajo idénticas condiciones analíticas.

El compuesto **8**, presentó un ion molecular de m/z 441. Su fragmentación dio lugar a un ion de m/z 289, correspondiente a (-)-epicatequina, y otro de m/z 169, correspondiente a ácido gálico, por lo que este compuesto se identificó como (-)-epicatequin-3-O-galato (Monagas *et al.*, 2003).

4.2.3 Ácidos Hidroxicinámicos (AHC).

Cuatro compuestos derivados de AHC se identificaron en las muestras en estudio (**Tabla 4.1**). Los compuestos **3**, **6** y **7**, la fragmentación de sus iones moleculares, de m/z 311, 295 y 325 respectivamente, dió lugar a un $[M-H-132]^-$ y un ion de m/z 149 (en el caso de los precursores de m/z 295 y 326). Los iones $[M-H-132]^-$ corresponderían a la pérdida de una molécula de ácido tartárico, que se encontraría esterificando la molécula, y que fue evidenciada por su ión a m/z 149, resultados que concuerdan con los descritos por Kammerer *et al.* (2004) e Ivanova *et al.* (2011a). Esta información permitió identificar a estos tres iones moleculares como ácido caftárico, coutárico y fertárico, respectivamente.

El compuesto **9**, presentó un ion molecular de m/z 179. Su fragmentación condujo a la formación de un ion de m/z 135 ($[M-H-44]^-$), generado por la pérdida de una molécula de CO_2 común en los AHC (Sun *et al.*, 2011). Este compuesto fue identificado como ácido cafeico y su presencia confirmada por comparación con el

tiempo de retención y características espectrales (UV-VIS, MS y MS/MS) del correspondiente estándar comercial bajo idénticas condiciones de análisis.

4.2.4 Ácidos Hidroxibenzoicos (AHB).

En las muestras analizadas lograron identificarse tres compuestos derivados de AHB (**Tabla 4.1**). El compuesto **1**, correspondió al ácido gálico y su presencia se confirmó por comparación con el tiempo de retención y características espectrales (UV-VIS, MS y MS/MS) del correspondiente estándar comercial bajo idénticas condiciones de análisis. Su ion molecular mostró una m/z 169 y su fragmentación dio lugar a un $[M-H-44]^-$, derivado de la pérdida de una molécula de CO_2 característico de los AHB (Sun *et al.*, 2011).

El compuesto **2**, presentó un m/z de 331, cuya fragmentación condujo a la formación de un ion de m/z 169 correspondiente al ácido gálico ($[M-H-162]^-$), generado por la pérdida de una molécula de azúcar. Este compuesto fue identificado como ácido gálico hexósido.

Por otro lado, el compuesto **10** con un máximo de absorbancia característico de AHB en la región UV del espectro, presentó un ion molecular de m/z 197. Su fragmentación dio lugar al ion de m/z 169, correspondiente al ácido gálico. Este compuesto se identificó como etil galato y su identificación fue confirmada de acuerdo a Monagas *et al.* (2003).

4.3 Cuantificación de polifenoles en las muestras.

El contenido de los compuestos polifenólicos identificados en las muestras tomadas para uva y vino blanco se muestra en la **Tabla 4.2**.

4.3.1 Ácidos Hidroxicinámicos (AHC).

Como puede observarse en la **Tabla 4.2**, los AHC presentes en las uvas fueron los derivados esterificados con ácido tartárico, o ácidos hidroxicinamoil tartárico, conocidos como ácido caftárico (derivado del ácido cafeico), coutárico (derivado del ácido *p*-cumárico) y fertárico (derivado del ácido ferúlico) (Monagas *et al.*, 2005). El ácido coutárico fue el más abundante tanto en uvas como vinos, seguido por los ácidos caftárico y fertárico, estando este último en niveles relativamente muy bajos para las

uvas en comparación a los AHC identificados (Barcia *et al.*, 2014). Los AHC cuantificados en uvas, también se cuantificaron en vino. Se sabe que a lo largo de la vinificación los ácidos hidroxicinamoil tartárico sufren hidrólisis (Ginjon *et al.*, 2011), por lo tanto, ácido cafeico, derivado de la hidrólisis del AHC más abundante en uvas, fue observado en vinos. Al igual que en las uvas, ácido coutárico fue el HCA predominante en los vinos (Ginjom *et al.*, 2011).

Tabla 4.2 Contenido de polifenoles en muestras tomadas de dos variedades blancas.

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

Compuesto	Uvas (mg/kg)		Vino (mg/ L)	
	Chardonay	Viognier	Chardonay	Viognier
Ácido Gálico	< LD	< LD	0,58 \pm 0,01	0,55 \pm 0,02
Ácido gálico-glucósido	3,95 \pm 0,72	5,07 \pm 0,31	< LD	< LD
Ácido Caftárico	37,46 \pm 9,19	17,83 \pm 1,16	2,37 \pm 0,15	2,45 \pm 0,26
(+)-Catequina	3,35 \pm 0,31	3,36 \pm 0,58	0,30 \pm 0,03	0,43 \pm 0,01
(-)-Epicatequina	8,88 \pm 1,09	10,09 \pm 0,30	0,13 \pm 0,03	0,15 \pm 0,04
Ácido Coutárico	51,72 \pm 2,16	24,7 \pm 1,96	5,96 \pm 0,54	3,05 \pm 0,01
Ácido Fertárico	7,48 \pm 0,40	6,11 \pm 0,31	2,81 \pm 0,08	3,29 \pm 0,21
(-)-Epicatequin-3-O-galato	0,10 \pm 0,02	0,07 \pm 0,01	< LD	< LD
Ácido Cafeico	< LD	< LD	4,80 \pm 0,40	1,91 \pm 0,02
Etil galato	< LD	< LD	2,75 \pm 0,10	2,88 \pm 0,37
Astilbina	1,78 \pm 0,44	0,51 \pm 0,04	0,10 \pm 0,01	0,34 \pm 0,05
Quercetin-3-glucurónido	2,85 \pm 0,29	2,25 \pm 0,46	0,15 \pm 0,01	0,25 \pm 0,01
Isoquercetina	13,54 \pm 0,63	12,85 \pm 2,91	< LD	< LD
Kaempferol-3-glucósido	1,84 \pm 0,04	1,53 \pm 0,01	< LD	< LD
Isorhamnetin-3-glucósido	0,24 \pm 0,61	0,14 \pm 0,02	< LD	< LD
Quercetina	0,20 \pm 0,05	0,36 \pm 0,01	0,11 \pm 0,07	0,11 \pm 0,02
Kaempferol	0,23 \pm 0,01	0,19 \pm 0,02	< LD	< LD

< LD: Menor al límite de Detección.

4.3.2 Ácidos Hidroxibenzoicos (AHB).

De acuerdo a la tabla **Tabla 4.2**, no se detectaron AHB en las uvas, sin embargo se encontró contenido de ácido gálico y etil galato en los vinos (Ginjom *et al.*, 2011 y Monagas *et al.*, 2005). El ácido gálico se extrae de las semillas luego de la hidrólisis de

sus ésteres con flavanoles, mediante la acción de esterasas, durante las primeras etapas de la vinificación. La esterificación del ácido gálico con etanol para formar etil galato, ha sido observada durante las etapas de fermentación y envejecimiento (Monagas *et al.*, 2005), lo que explicaría la presencia en vinos.

4.3.3 Flavonoles.

Estos compuestos también se encuentran en la piel de las uvas (Castillo-Muñoz *et al.*, 2007). De acuerdo a la **Tabla 4.2** los flavonoles glicosilados fueron los compuestos polifenólicos abundantes en las uvas. El flavonol glicosilado mayoritario en las uvas fue isoquercetina (Castillo-Muñoz *et al.*, 2007).

Por el contrario, ambas variedades de vinos no se observan presencia de éste flavonol. Quercetina fue el flavonol presente en las uvas y en los vinos aunque en menor proporción, debido a que deriva de la hidrólisis de la isoquercetina (Ruberto *et al.*, 2007).

4.3.4 Flavanoles.

Los flavan-3-oles o flavanoles incluyen formas monoméricas, oligómeros y polímeros (las últimas dos también conocidos como proantocianidinas o taninos condensados), y se localizan en las partes sólidas de la uva, siendo las semillas las que presentan la mayor concentración (Monagas *et al.*, 2003 y 2005).

Como puede verse en la **Tabla 4.2**, el perfil de flavanoles de las uvas estuvo conformado principalmente por los monómeros de catequina, (-)-epicatequina y (-)-epicatequin-3-O-galato.

Entre los compuestos detectados en uvas, (-)-epicatequina fue el mayoritario para ambas variedades de uvas blancas. En el vino el mayoritario fue la epicatequina, que puede deberse a la isomerización de estos compuestos durante la vinificación o a una mayor transferencia desde la uva durante la vinificación.

4.4 Actividad antioxidante *in vitro*.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la capacidad antioxidante (CA) *in vitro* para las uvas y los vinos blancos de la variedad Chardonnay y Viognier.

La Figuras 4.3 y 4.4 muestran los resultados obtenidos de la capacidad antioxidante (CA) *in vitro* medida por los ensayos FRAP, TEAC y DPPH.

Se observó una tendencia similar para los tres ensayos empleados. En este sentido, entre las muestras de uva, la variedad Chardonay mostró la mayor CA para el ensayo TEAC, mientras que en los ensayos restantes no hubo diferencias significativas entre variedades. Los resultados obtenidos para la CA de las uvas evaluadas mediante el ensayo de FRAP (valor promedio 9.48 mmol trolox / kg uva entre variedades) fueron mayores a los informados por Cilla *et al.* (2010). Para TEAC (valor promedio entre variedades 10.86 mmol trolox/ kg uva) los valores estuvieron en línea con los informados por Cilla *et al.* (2010). Mientras que para el DPPH el valor promedio entre variedades fue de 10.86 mmol trolox/ kg uva.

Cabe destacar que la comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con los obtenidos por otros autores es difícil, sobre todo por la variabilidad metodológica presente en la bibliografía consultada.

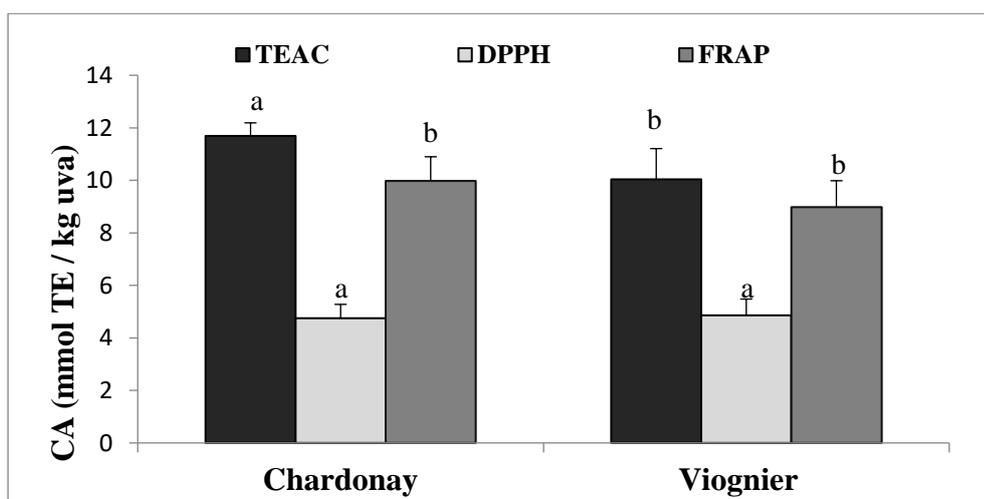


Figura 4.3. Capacidad Antioxidante (CA) evaluada por los métodos FRAP, ABTS y DPPH en muestras de uva.

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre variedades para cada ensayo.

En cuanto a la CA de los vinos, el valor promedio de FRAP fue de 0,22 mmol trolox / L vino, mientras que el valor promedio TEAC fue de 0,67 mmol trolox / L vino entre variedades y el valor promedio para DPPH fue de 0,35 mmol trolox / L vino.

Tanto en el caso de las uvas como para los vinos, se observó una tendencia similar para los tres ensayos empleados. Solo existieron diferencias significativas entre variedades de uvas y vino para el ensayo de TEAC.

Al comparar entre matrices, se observó que la CA de los vinos Chardonnay y Viognier fue significativamente menor que la de sus respectivas materias primas.

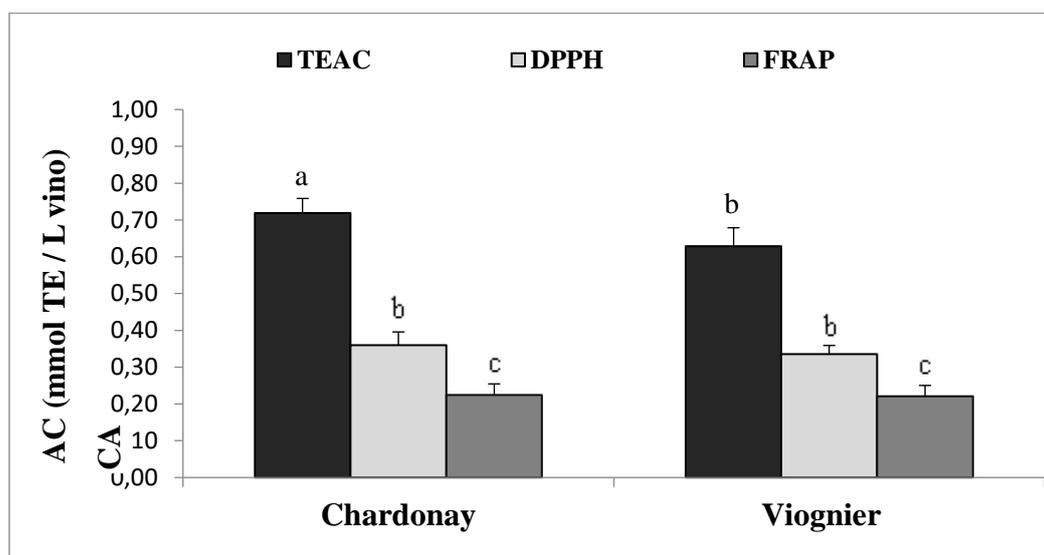


Figura 4.3. Capacidad Antioxidante (CA) evaluada por los métodos FRAP, ABTS y DPPH en muestras de vino.

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre variedades.

Teniendo en cuenta que los ensayos empleados para evaluar la CA en este estudio ocurren por diversos mecanismos de reacción, específicamente SET y HAT, las diferencias observadas en la CA entre variedades y muestras podrían deberse a las diferencias en los potenciales redox y características estructurales, como nivel de hidroxilación y extensión de la conjugación, de los compuestos polifenólicos individuales constituyentes de las muestras en cada etapa del proceso (Pulido *et al.*, 2000; Rockenbach *et al.*, 2011).

Se sabe que según la estructura química de los compuestos fenólicos, reaccionarán de manera diferente en los ensayos in vitro de acuerdo con los diferentes mecanismos involucrados (átomo de hidrógeno, transferencia de un solo electrón, poder reductor y quelación de metales, entre otros) (Ginjom *et al.*, 2011). La capacidad antioxidante de un alimento es el resultado de los efectos sinérgicos y / o antagónicos de la interacción de los diferentes compuestos polifenólicos entre sí y con otros

componentes de la matriz alimentaria o del organismo, como proteínas, carbohidratos y lípidos (Lingua *et al.*, 2016).

De acuerdo a estos resultados, podemos decir que la variedad Chardonay se destacó por presentar la mayor CA en todas las muestras estudiadas tanto en la uva como en el vino.

4.5 Proceso de digestión gastro-intestinal *in vitro*.

Para los ensayos de digestión gástrica *in vitro* se utilizó una mezcla representativa en partes iguales de las dos variedades tanto para vino como para uva. A continuación se muestran los resultados obtenidos para los cambios en el perfil de polifenoles y capacidad antioxidante (CA) de la uva y del vino a lo largo de un proceso que simula la digestión gastro-intestinal humana y posterior absorción a través del epitelio intestinal.

El efecto de la digestión gastrointestinal sobre el perfil de polifenoles y la capacidad antioxidante de la uva y del vino, se estudiaron en 3 etapas: la primera corresponde al alimento luego de su digestión en la boca (Boca), la segunda luego de su digestión en el estómago (Gástrico), y la última luego de su digestión y absorción en el intestino (Dializable y No dializable). La porción Dializable representa la fracción de polifenoles que atravesará del epitelio intestinal, al torrente sanguíneo y estaría disponible para llegar al órgano o tejido donde ejercería su acción antioxidante, mientras que la “no dializable” estaría representando a los polifenoles que pasarían al colon ejerciendo su acción posiblemente a nivel de microflora colónica.

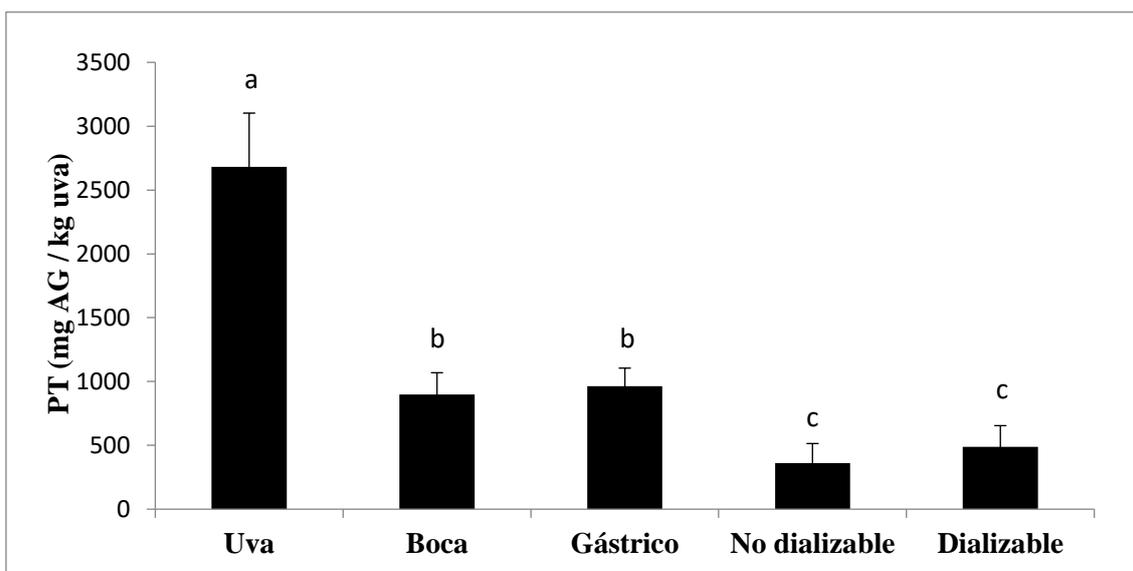


Figura 4.5 Cambios en los polifenoles totales (PT) a lo largo de la digestión gastrointestinal *in vitro* de la uva blanco.

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre etapas de la digestión.

Como puede observarse en la Figura 4.5, luego de la masticación menos de la mitad de los polifenoles totales de la uva se encuentran presentes (34 %), es decir han sido liberados de la matriz del alimento en comparación al extracto de la uva.

En la etapa de la digestión gástrica vemos que se mantienen el porcentaje de polifenoles liberados a partir de las uvas (37 % del total de polifenoles del extracto de uva). Estos resultados demostrarían que el proceso de masticación y la digestión en el estómago son etapas fundamentales en la digestión de una matriz alimenticia sólida, como es el caso de la uva, ya que permiten liberar los compuestos polifenólicos para su potencial beneficio sobre el organismo. Al terminar la etapa de digestión en el intestino, se observó una disminución significativa en el contenido de PT. Solo el 14 % de los PT de la uva se encontraron en la fracción colon viable (es decir que se encuentran en el intestino), y un 18 % en la fracción de polifenoles posiblemente biodisponibles (es decir aquellos que pasaron la membrana de diálisis).

La degradación de los polifenoles durante la digestión intestinal ha sido previamente observada por otros autores (Celep *et al.*, 2015; Cilla *et al.*, 2009; Podsedęk *et al.*, 2014; Rodríguez-Roque *et al.*, 2013; Tagliazucchi *et al.*, 2010), quienes atribuyeron lo sucedido principalmente a la inestabilidad química de los polifenoles al

medio alcalino intestinal (pH 7,5), como así también a las posibles interacciones con otros componentes del ensayo de digestión *in vitro* tales como las enzimas pancreáticas.

Como puede observarse en la **Tabla 4.3**, de los 13 compuestos que inicialmente se cuantificaron en la uva, solo 4 fueron capaces de atravesar la membrana de diálisis, representando entonces la fracción de compuestos dializables. Entre ellos, el más abundante fue el ac. gálico-glucósido con porcentaje de recuperación (% R) del 73 %. En cuanto a la fracción colon viable, (**Tabla 4.3**) solo 6 compuestos fueron recuperados. Nuevamente el más abundante fue el ac. gálico-glucósido, seguido por el ac. fertárico con % R del 18 y 7 %, respectivamente.

Tabla 4.3 Contenido de polifenoles en la uva y en las etapas de digestión colon viable y biodisponible.

Compuesto	Uva	No dializable (%R)	Dializable (%R)
Ácido Gálico	< LD	< LD	< LD
Ácido gálico-glucosido	4,33 ± 0,67	0,79 ± 0,21 (18)	3,17 ± 0,49 (73)
Ácido Caftárico	27,26 ± 3,62	< LC	< LD
(+) Catequina	3,06 ± 0,67	< LD	< LD
(-)-Epicatequina	9,45 ± 1,71	< LD	< LD
Ácido Coutárico	28,71 ± 0,42	< LC	< LD
Ácido Fertárico	6,44 ± 0,25	0,46 ± 0,02 (7)	< LC
(-) Epicatequin-3-O-galato	0,07 ± 0,02	< LD	< LD
Ácido Cafeico	< LD	< LD	< LD
Etil galato	< LD	0,02 ± 0,01 (1,2)	< LD
Astilbina	0,23 ± 0,07	< LC	< LC
Quercetin-3-glucurónido	2,53 ± 0,26	0,16 ± 0,07 (6)	0,11 ± 0,05 (4,3)
Isoquercetina	15,05 ± 3,60	0,11 ± 0,06 (0,8)	0,19 ± 0,18 (1,2)
Kaempferol-3-glucósido	1,87 ± 0,30	0,06 ± 0,03 (3)	0,37 ± 0,22 (19,5)
Isorhamnetin-3-glucósido	0,22 ± 0,02	< LC	< LC
Quercetina	0,31 ± 0,10	< LD	< LD
Kaempferol	0,19 ± 0,02	< LD	< LD

< LD: Menor al límite de Detección. < LC: Menor al límite de Cuantificación. %R: porcentaje de recuperación con respecto al alimento original.

Con respecto al vino, también se analizaron los cambios a lo largo de la digestión del vino blanco. Como vemos en la Figura 4.6, los cambios en el contenido de PT durante la digestión muestran una tendencia similar a la digestión de la uva.

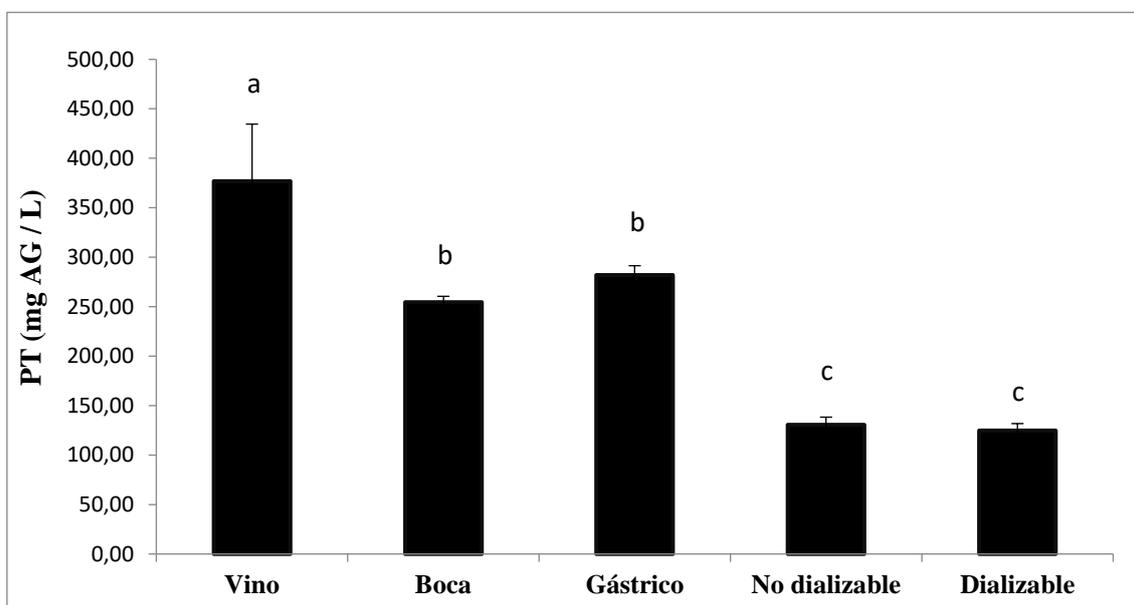


Figura 4.6. Cambios en los polifenoles totales (PT) a lo largo de la digestión gastrointestinal *in vitro* del vino blanco.

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre etapas de la digestión.

Luego de la masticación hay una disminución moderada en los polifenoles totales, el 67 % de los polifenoles se encuentran presentes con respecto al vino. En cuanto a la digestión en el estómago el 74 % de los polifenoles con respecto al vino, resistieron las condiciones digestivas, sin diferenciarse significativamente de la boca. Este hecho probablemente se deba a que el vino es una matriz alimenticia líquida y, por lo tanto, en este tipo de matrices todos los compuestos polifenólicos se encuentran liberados, sin la necesidad de ser extraídos de un tejido vegetal durante la masticación y la digestión en el estómago (Tagliazucchi *et al.*, 2010).

Finalmente, se observa que luego de la digestión intestinal existe una disminución significativa de los PT. Solo el 34% y el 33% de los polifenoles totales del vino se encontraron en la fracción no dializable (es decir que se encuentran en el

intestino) y dializable (es decir aquellos que pasaron la membrana de diálisis), respectivamente.

Al igual que en las uvas, vuelve a poner en evidencia la inestabilidad química de las moléculas de los polifenoles al medio alcalino intestinal (pH 7,5), como así también a las posibles interacciones entre éstos y otros componentes del ensayo de digestión in vitro tales como las enzimas digestivas.

Tabla 4.4: Contenido de polifenoles en el vino y en las etapas de digestión colon viable y biodisponible.

Compuesto	Vino	No dializable (%R)	Dializable (%R)
Ácido Gálico	0,52 ± 0,02	< LD	< LD
Ácido gálico-gluc	< LD	< LD	< LD
Ácido Caftárico	2,32 ± 0,17	1,28 ± 0,10 (56)	< LD
(+) Catequina	0,39 ± 0,04	0,04 ± 0,01 (9)	< LC
(-)-Epicatequina	0,13 ± 0,01	< LD	< LD
Ácido Coutárico	5,47 ± 0,22	2,79 ± 0,11 (51)	2,78 ± 0,08 (51)
Ácido Fertárico	2,57 ± 0,05	1,40 ± 0,11 (54)	< LC
(-) Epicatequin-3-O-galato	< LD	< LD	< LD
Ácido Cafeico	2,15 ± 0,12	< LD	< LD
Etil galato	2,90 ± 0,18	1,24 ± 0,03 (43)	2,29 ± 0,03 (79)
Astilbina	0,21 ± 0,02	0,08 ± 0,02 (39)	< LC
Quercetin-3-glucurónido	0,138 ± 0,003	0,0660 ± 0,0005 (48)	< LD
Isoquercetina	< LD	< LD	< LD
Kaempferol-3-glucósido	< LD	< LD	< LD
Isorhamnetin-3-glucósido	< LD	< LD	< LD
Quercetina	0,11 ± 0,01	0,030 ± 0,003 (28)	0,06 ± 0,01 (55)
Kaempferol	< LD	< LD	< LD

< LD: Menor al límite de Detección. < LC: Menor al límite de Cuantificación. %R: porcentaje de recuperación con respecto al alimento original.

Como puede observarse en la **Tabla 4.4**, de los 11 compuestos que inicialmente se cuantificaron en el vino, solo 3 fueron capaces de atravesar la membrana de diálisis, representando entonces la fracción de compuestos potencialmente biodisponibles. Entre ellos, los más abundantes fueron el ácido coutárico y el etil galato, con % R del 50 y 79

% respectivamente. En cuanto a la fracción colon viable, (**Tabla 4.4**) solo 8 compuestos fueron recuperados. Los más abundantes fueron el ácido coutarico, fertárico, caftarico y etil galato con % de R de 51, 54, 55 y 43 % respectivamente.

Asumiendo que la diálisis durante el ensayo permitió simular la absorción pasiva de los compuestos polifenólicos a través del intestino delgado, podría decirse que los compuestos observados en la fracción dializable de dichos alimentos estarían potencialmente disponibles para su absorción *in vivo*, influyendo en la actividad celular para finalmente ejercer su potencial efecto benéfico sobre la salud del hombre.

Por otro lado los resultados de los polifenoles no dializables tanto para uva y vino, indicarían que cantidades importantes de compuestos polifenólicos permanecerían en el tracto intestinal, dirigiéndose al colon. Es un hecho bien conocido que el colon contiene un diverso ecosistema de microorganismos que degradan y transforman los componentes no digeridos a metabolitos microbianos.

Según los resultados obtenidos hasta este momento muestran que la estabilidad y bioaccesibilidad de los compuestos polifenólicos de la uva y el vino son considerablemente influenciadas por el proceso de digestión gastro-intestinal. Estos cambios en la composición polifenólica de los alimentos son los que finalmente determinan su acción antioxidante en el organismo.

Comparando los resultados de ambas muestras (uva y vino), se pudo observar que luego de la digestión en la boca y estómago, hay menos compuestos bioaccesibles para uvas (en comparación con el contenido en el alimento original) que para vino, lo cual es probablemente debido a la diferencias en la matriz del alimento. En frutas sólidas, como las uvas, los polifenoles deben extraerse de la matriz alimentaria para ser bioaccesibles, mientras que en muestras líquidas, como el vino, los polifenoles ya están accesibles (Lingua *et al.*, 2018). Por otro lado, la transición de muestras de digestión estomacal al ambiente simulado del intestino delgado produjo una disminución notable en compuestos fenólicos en ambos tipos de muestra. Esta disminución en el contenido de PT puede estar asociada con el pH, que cambia a lo largo de la digestión gastrointestinal, ya que los polifenoles son inestables en un medio neutro o alcalino, como es el intestino delgado (pH 7.5) mostrando una mejor resistencia a las condiciones estomacales (pH 2) (Arenas y Trinidad, 2017; Burgos *et al.*, 2017; Celep *et al.*, 2015; Sanz-Buenhombre *et al.*, 2016). Además, las enzimas digestivas gastrointestinales estimulan la liberación de compuestos fenólicos de la matriz de la muestra, siendo esto

aparentemente un proceso desfavorable para la estabilidad de la estructura de los polifenoles y, en consecuencia, podrían estar sujetos a hidrólisis (Bouayed *et al.*, 2011; McDougall *et al.*, 2005).

En el caso del vino, el cual no tuvo una protección en la matriz, las pérdidas en los polifenoles fueron menores. Posiblemente se debe a que el vino sufre un proceso tecnológico, donde se conservan los polifenoles más resistentes.

4.6 Capacidad Antioxidante *in vitro*

A continuación por medio de los distintos ensayos FRAP, TEAC Y DPPH se determinó la capacidad antioxidante en todas las etapas del proceso digestivo, y así poder observar la modificación de la acción oxidante en la uva y el vino.

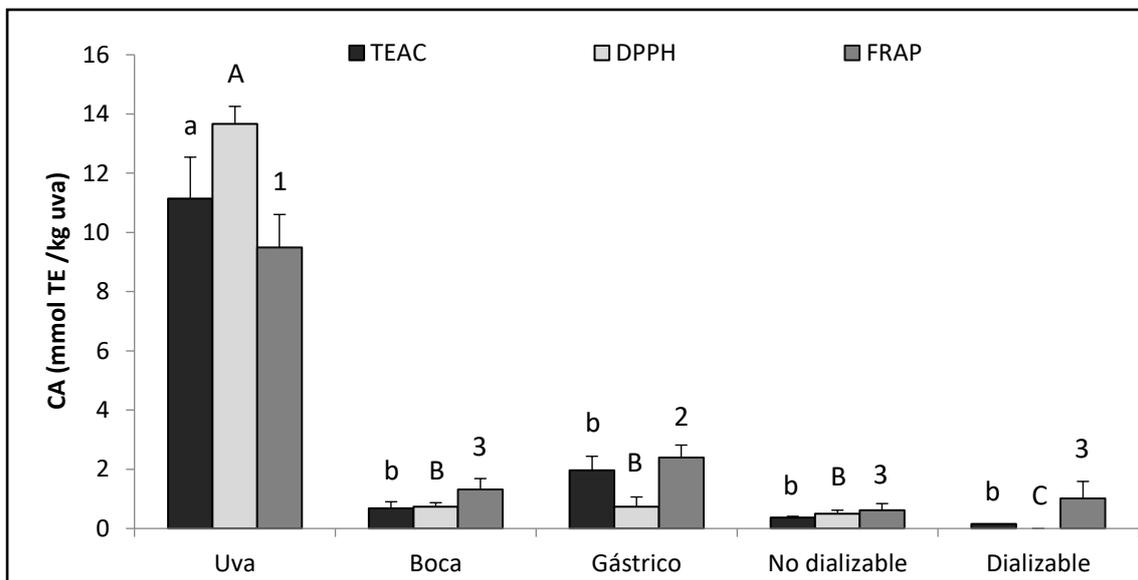


Figura 4.7 Cambios en la capacidad antioxidante (CA) *in vitro* de la uva blanca a lo largo del proceso simulado de digestión gastro-intestinal.

Letras y números diferentes indican diferencias estadísticamente significativas para cada ensayo entre las diferentes etapas de la digestión (boca, gástrico, colon viable y biodisponible) $p < 0,05$.

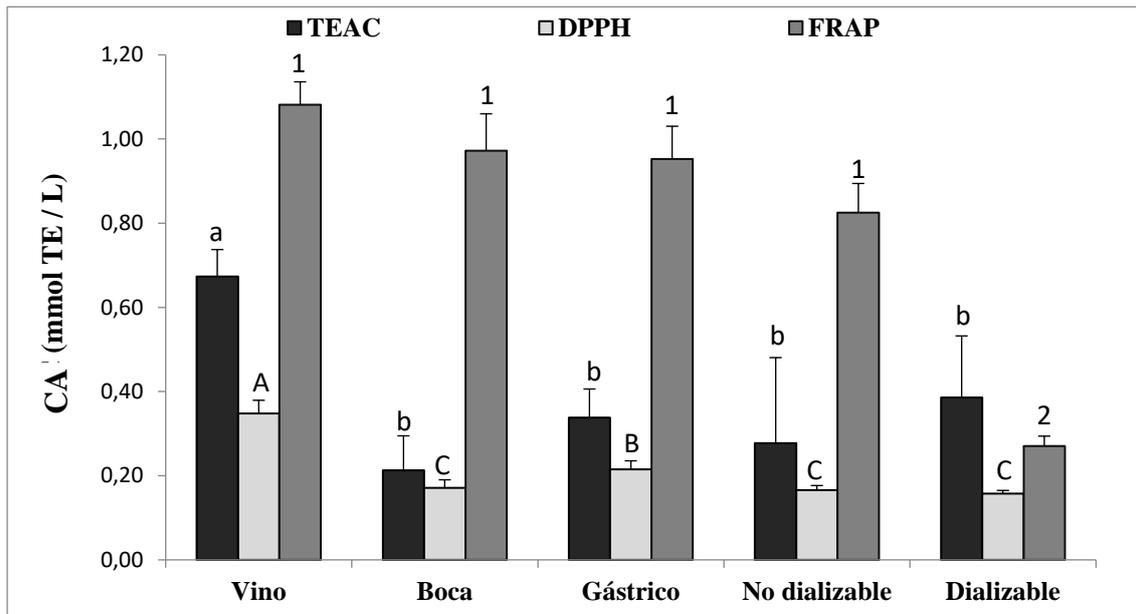


Figura 4.8 Cambios en la capacidad antioxidante (CA) *in vitro* del vino blanco a lo largo del proceso simulado de digestión gastrointestinal.

Letras y números diferentes indican diferencias estadísticamente significativas para cada ensayo entre las diferentes etapas de la digestión (boca, gástrico, colon viable y biodisponible) $p < 0,05$.

Con el fin de estudiar cómo la acción antioxidante de la uva y el vino se modifica a lo largo del proceso digestivo se determinó la CA *in vitro* por medio de los ensayos FRAP, ABTS y DPPH en cada etapa del proceso digestivo. Las Figuras 4.7 y 4.8 muestran los resultados obtenidos para la uva y el vino, respectivamente. Se observó que los valores de CA determinados por los tres ensayos *in vitro* para ambos alimentos mostraron una tendencia similar a lo largo del proceso digestivo. En el caso de la digestión de la uva (Figura 4.7) se puede observar que la CA luego de la masticación fue significativamente menor en comparación a la CA del extracto de uva, lo cual concuerda con el bajo contenido de PT extraídos luego de la masticación en comparación a la uva. Luego de la digestión gástrica la CA no se modifica en comparación a la boca. Finalmente, luego de la digestión en el intestino la CA disminuye al igual que el contenido de PT como fue demostrado en los resultados previamente discutidos (Figura 4.7).

En el caso de los vinos (Figura 4.8) se observó que luego de la digestión en la boca la CA fue significativamente menor en comparación al vino para TEAC y DPPH, pero mantuvo valores similares para FRAP. Esto estaría indicando que dependiendo del perfil de polifenoles, estos ejercerían su actividad por una u otra vía de acción (poder

reductor en este caso); la CA del resto de las etapas de la digestión mostró la misma tendencia que el contenido de PT.

En resumen, para ambos alimentos se observó que las variaciones en la CA a lo largo de la digestión podrían ser explicadas en líneas generales por los cambios observados en el contenido de PT, aunque influencia del perfil polifenólico derivado del proceso pudo ser detectada. Este estudio demostró que a pesar de la disminución en la capacidad antioxidante *in vitro*, las fracciones dializable y no dializable mantienen esta propiedad. Por lo tanto es interesante estudiar las propiedades antioxidantes post digestión a nivel celular. El intestino es el sitio primario de acción para los componentes antioxidantes que provienen de la dieta, por lo que las células Caco-2 son un modelo apropiado para estudiar el efecto antioxidantes de componentes de la dieta (Cilla et al., 2008; Seiquer et al., 2015; Wang et al., 2016).

4.7 Evaluación de la capacidad antioxidante *ex vivo*.

La prevención de la citotoxicidad causada por una solución de peróxido de hidrógeno sobre las células Caco-2, fue utilizada como una medida indirecta de los efectos antioxidantes de los distintos extractos de polifenoles. Para lo cual fue necesario determinar en una primera etapa, una concentración de H₂O₂ capaz de inducir aproximadamente 40 % de citotoxicidad cuando las células se incubaban con el oxidante por 1 hora.

4.7.1. Tratamiento oxidante sobre células Caco-2: Elección de la concentración de H₂O₂.

En la Figura 4.9 se observan las características citomorfológicas de células cultivadas por 49 h con el medio de cultivo (DMEM) (A), y de células cultivadas 48 h con DMEM a las que posteriormente se les indujo estrés oxidativo mediante la incubación con H₂O₂ 7,8 mM en DMEM (B).

A las 49 h de cultivo en DMEM (Figura 4.9), las células se observaron fundamentalmente en grupos, extendidas, mostrando buena adherencia al sustrato (con excepción de aquellas células que se encuentran en alguna de las etapas de mitosis, para lo que necesitan despegarse del plástico), y con una confluencia aproximada de 60-70 %. Se pudieron diferenciar límites celulares y zonas de contacto intercelulares bien delimitados, con núcleos de tamaños y morfologías heterogéneos en los que se

identificaron números variables de nucléolos, citomorfologías características de las células Caco-2 cultivadas en ausencia de condiciones estresantes. En la Figura 4.9 B se observan las alteraciones citomorfológicas causadas por una de las concentraciones de H_2O_2 ensayadas (7,8 mM), mediante la cual se indujeron cambios morfológicos evidentes, aunque no fueron de severidad extrema. Este tratamiento oxidante causó la condensación de las células, las cuales presentaron bordes sinuosos y evidencias de pérdida parcial de la adherencia al sustrato. Los citoplasmas se observaron heterogéneos, granulados en muchos casos, con núcleos más chicos, todos signos muy claros de sufrimiento celular. Cuando el H_2O_2 se utilizó en concentraciones \geq a 125 mM, se observó citotoxicidad severa, evidenciada por el desprendimiento completo del sustrato de prácticamente la totalidad de las células, las cuales se observaban condensadas, picnóticas, con superficies rugosas.

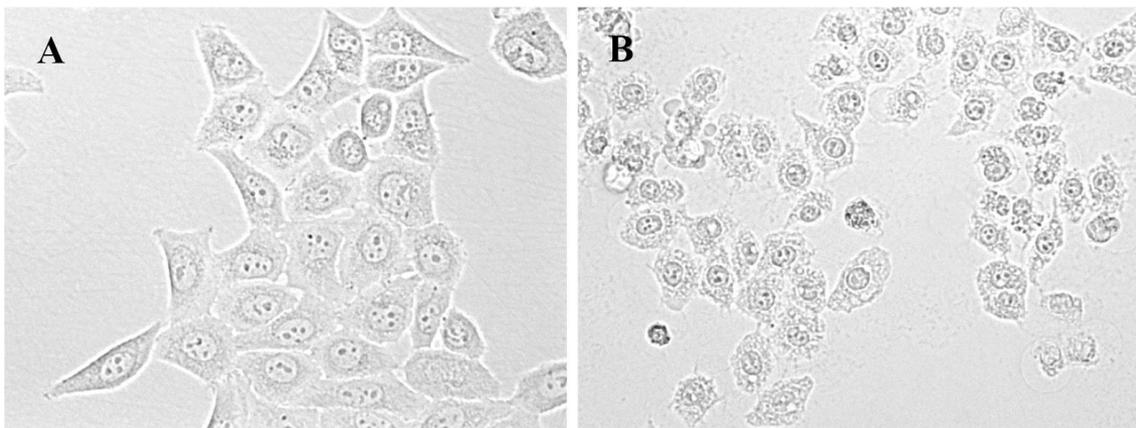


Figura 4.9 Características citomorfológicas de las células Caco-2 en cultivo con DMEM (A), y sometidas a un tratamiento oxidante (H_2O_2 7,8 mM en DMEM, 1 hora) (B).

Magnificación: 200x.

Como se mencionó anteriormente, las viabilidades celulares fueron evaluadas mediante el ensayo del MTT. En la Figura 4.10 se observan las características morfológicas de las células inmediatamente después de incorporar la solución de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolio bromuro (A); y luego de 1 hora de incubación con el MTT, donde pueden observarse los gránulos intracelulares de formazán (B).

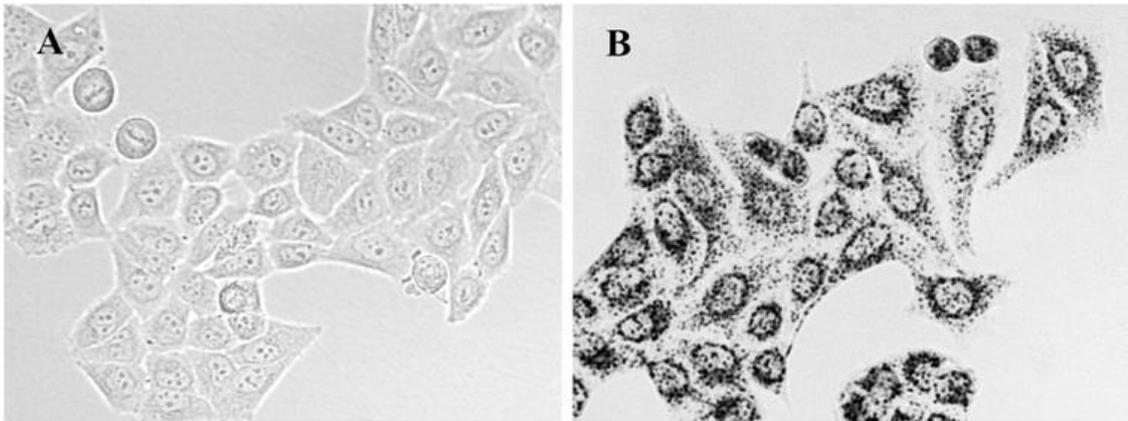


Figura 4.10: Morfología de las células Caco-2 al inicio (A), y después de 1 hora de incubación con el MTT (B).

Magnificación: 200x.

En la Figura 4.11 se muestran resultados representativos (de tres experimentos independientes, 6 repeticiones de cada tratamiento) de las soluciones obtenidas mediante disolución de los gránulos intracelulares de formazán (A), y los porcentajes de viabilidad en células tratadas con H_2O_2 (1 – 250 mM) con respecto a las incubadas con el medio de cultivo solo (DMEM) (B).

Las soluciones oxidantes de H_2O_2 redujeron la viabilidad en todo el rango de concentraciones evaluado. En términos generales, se puede decir que concentraciones < 4 mM de H_2O_2 causaron citotoxicidades de alrededor del 20 %. Mientras que concentraciones \geq a 31,3 mM causaron la muerte de más del 80 % de las células. En células incubadas con H_2O_2 7,8 mM se observó una viabilidad celular alrededor del 70 %, que se redujo a aproximadamente 20 % cuando la concentración de la solución oxidante se incrementó al doble, mostrando la mayor sensibilidad de las células en este rango de concentraciones.

La citotoxicidad causada por 7,8 mM (30 %) podría ser considerada como “moderada”, por lo que esta condición fue seleccionada para inducir estrés oxidativo en los ensayos subsiguientes, con el objeto de evaluar las actividades antioxidantes de los extractos de polifenoles.

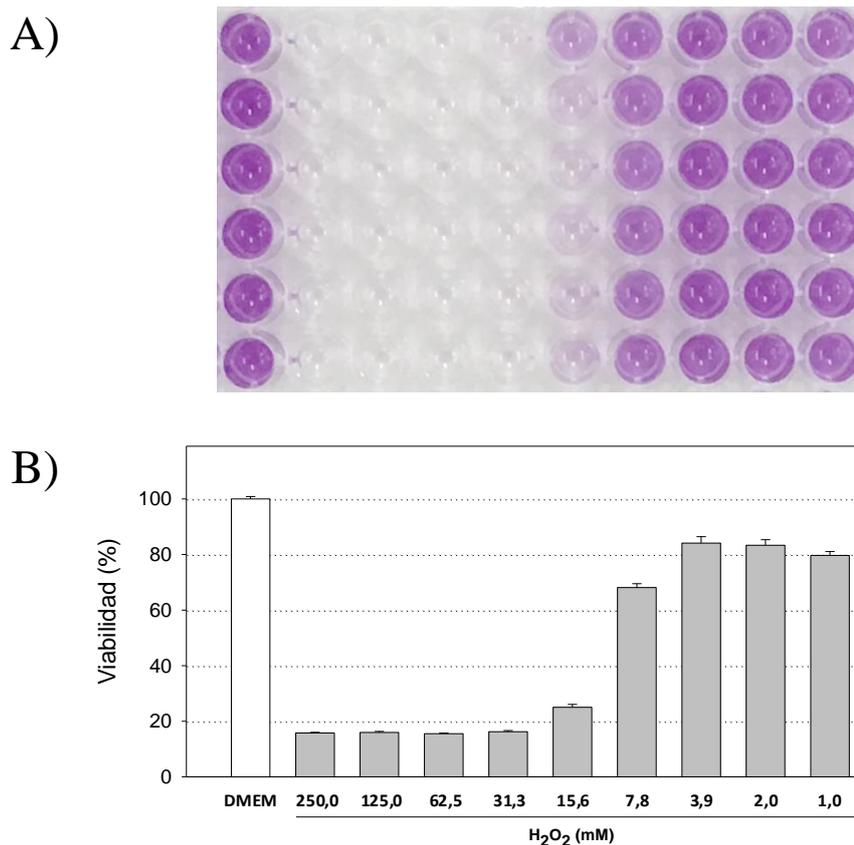


Figura 4.11 Sensibilidad de células Caco-2 a tratamientos oxidativos con H₂O₂.

Soluciones obtenidas mediante disolución de los gránulos intracelulares de formazán (A), y porcentajes (media \pm error estándar) de viabilidad en células incubadas con H₂O₂ (1 – 250 mM), con respecto al control (DMEM) (B).

4.7.2. Evaluación de la toxicidad de los extractos de polifenoles para las células Caco-2:

Previo a la determinación de la actividad antioxidante de los extractos de polifenoles, se evaluaron sus toxicidades para las células Caco-2 (Figura 4.12). El 100 % de viabilidad se atribuyó a la absorbancia observada en el grupo Control, mientras que las viabilidades encontradas en los diferentes tratamientos se calcularon como $\text{Abs}_{\text{Tratamiento}} / \text{Abs}_{\text{Control}} \times 100$. Todas las pruebas se realizaron por triplicado para cada condición experimental, y cada experimento se repitió al menos tres veces.

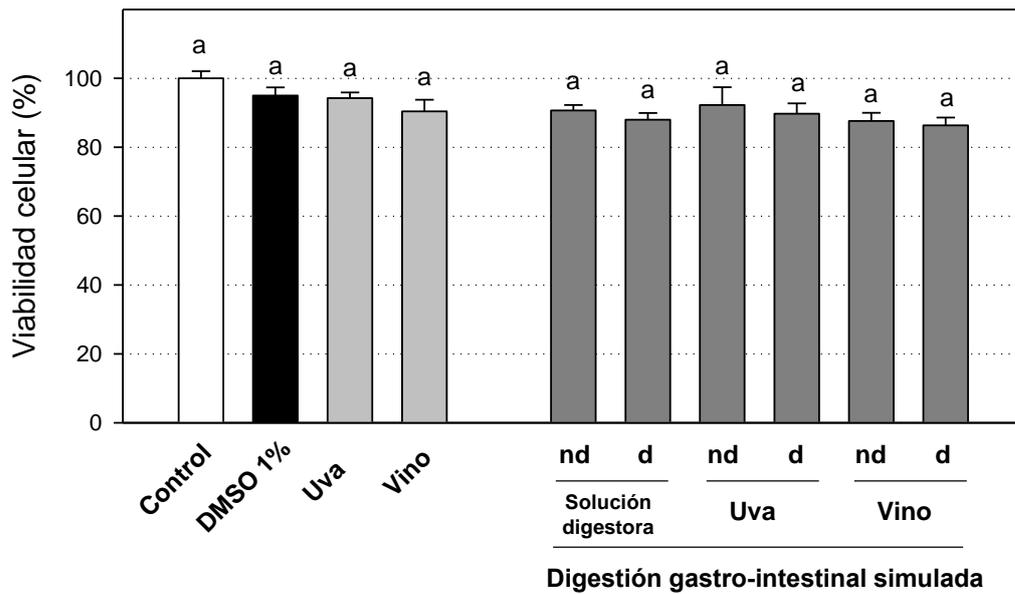


Figura 4.12 Toxicidad de uva y vino blanco y sus correspondientes muestras digeridas.

Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,01$). nd: no dializable; d: dializable

Ninguno de los extractos de polifenoles evaluados en este estudio (Uva, Vino, y sus digeridos dializables y no dializables) indujo toxicidad estadísticamente significativa cuando las células Caco-2 fueron incubadas por 24 horas con 20 ng de PFs totales por mL de medio de cultivo. Teniendo en cuenta que se consideran citotóxicos aquellos compuestos que disminuyen la viabilidad celular en al menos 15 %, podemos concluir que las muestras de uva y vino y sus correspondientes digeridos no fueron citotóxicas para las células. Si bien se observó una tendencia de reducción leve de la viabilidad por la exposición de las células a 1 % de DMSO (vehículo de los polifenoles), efecto tóxico ampliamente descrito de este disolvente en la gran mayoría de las células eucariotas, no hubo diferencias al comparar los resultados de este grupo, con respecto a las células incubadas con DMEM (Control). Se registraron resultados similares en relación a la toxicidad de la solución digestora, preparada mediante el agregado secuencial de todos los reactivos para simular las digestiones Bucal + Gástrica + Intestinal, pero reemplazando las uvas y vinos por H₂O.

4.7.3. Evaluación de las actividades antioxidantes de los extractos de polifenoles sobre las células Caco-2.

Se estudiaron las actividades antioxidantes *ex vivo* de los extractos de polifenoles digeridos, dializables y no dializables ya que los compuestos allí presentes serían los que efectivamente estarían alcanzando las células para cumplir su bioactividad, en comparación con los extractos sin digerir.

Cuando se indujo estrés oxidativo por H₂O₂ (7,8 mM) se observó toxicidad y la viabilidad celular fue solo del 60 % en comparación del control (células incubadas con DMEM), mostrando el efecto nocivo del peróxido (Figura 4.13). Sin embargo, el tratamiento previo con las distintas muestras conteniendo los polifenoles, previno en distintos grados, el daño celular provocado por el oxidante (Figura 4.13). Los extractos de uvas blancas aumentaron en un 9,8 % la viabilidad celular en comparación con las células expuestas a H₂O₂, y los vinos blancos la aumentaron en un 10,6 % (sin diferencias vino-uva). Entonces, a una misma concentración de PT el efecto biológico fue similar, lo que indica que los cambios cualitativos y cuantitativos ocurridos en el perfil fenólico de la uva como consecuencia de la vinificación, no alteran la bioactividad de sus antioxidantes.

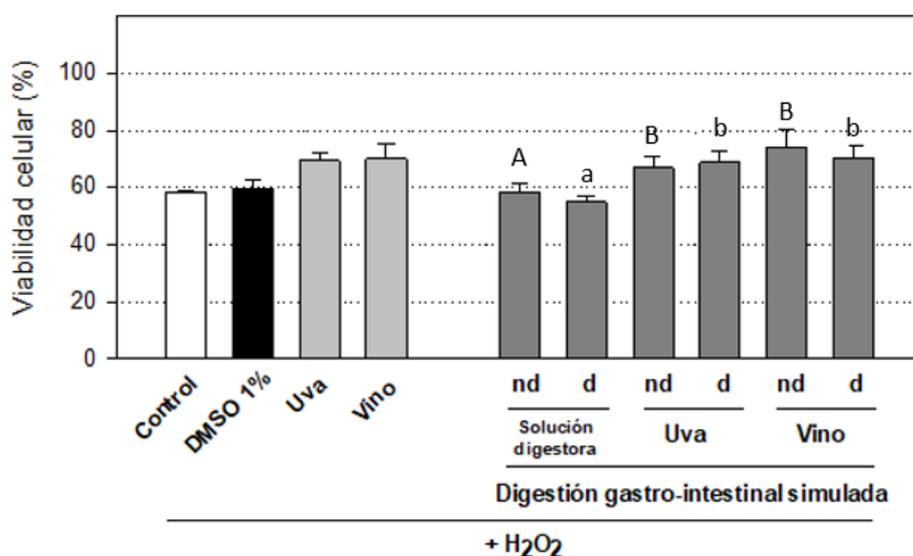


Figura 4.13 Efecto protector de los polifenoles contra estrés oxidativo generado por el H₂O₂.

Las diferentes letras indican diferencias significativas (p < 0,01). nd: no dializable; d: dializable

Después del proceso de digestión *in vitro*, el efecto biológico de las uvas y los vinos no cambiaron significativamente. Las fracciones dializables de los digeridos de las uvas y vinos también demostraron tener la capacidad de rescatar a las células del estrés oxidativo, aumentando la viabilidad celular en 13,9 % y 15,2 % respectivamente. Las fracciones no dializables de uvas y vinos digeridos mostraron un aumento de 8,7 % y 15,9 % de viabilidad celular, respectivamente (Figura 4.13).

En este estudio, a las mismas concentraciones de polifenoles totales, las actividades antioxidantes celulares de todas las fracciones digeridas de uvas y vinos fueron comparables a las de sus precursoras sin digerir (sin diferencias estadísticamente significativas).

Las capacidades antioxidantes celulares de uva y vino blanco son el resultado de un efecto sinérgico y antagónico de diferentes polifenoles presentes en muestras y con otros componentes del organismo (Lingua *et al.*, 2016). En caso de muestras digeridas, la capacidad antioxidante celular depende de los cambios cualitativos y cuantitativos ocurridos en el perfil fenólico nativo como consecuencia de la digestión gastrointestinal de los alimentos.

Teniendo en cuenta lo observado, los polifenoles más resistentes a la digestión gastrointestinal fueron el ácido gálico-glucósido para la fracción dializada de uvas y ácido coutarico, etil galato y quercetina para la fracción dializada del vino. Por otro lado el ácido gálico-glucósido también fue el polifenol más importante para la fracción de uva no dializada; mientras que los ácidos caftárico, fertárico y coutárico fueron los más resistentes para la fracción no dializada de vino. Por lo tanto, los ácidos fenólicos, además de la quercetina, serían los polifenoles más relevantes para explicar la CA celular observado en uvas blancas y vinos digeridos.

En un estudio previo donde se utilizó la piel de uva blanca, los autores indicaron que el proceso de digestión *in vitro* atenuó el efecto biológico de los polifenoles en la línea celular intestinal humana (HT-29) (Garbetta *et al.*, 2018). Por otro lado, otros estudios indicaron un aumento de la CA de extractos de frutas después de la digestión (evaluados por los métodos ABTS y ORAC), lo que se asoció con la liberación de compuestos fenólicos por la digestión (Pavan *et al.*, 2014)

5. CONCLUSIONES

El presente estudio reporta la influencia de la vinificación y la digestión gastro-intestinal *in vitro* sobre el perfil fenólico y la capacidad antioxidante de la uva blanca y su correspondiente producto de vinificación. Los resultados demuestran que luego de la vinificación hay una disminución del contenido de polifenoles totales, como también la capacidad antioxidante evaluada por técnicas *in vitro* como DPPH, FRAP y ABTS.

Por otro lado, la digestión gastro-intestinal también tuvo un efecto reductor sobre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante *in vitro*, sin embargo tanto las fracciones digeridas (dializadas y no dializadas) de ambos alimentos continuaron reteniendo cierta actividad. Además, al evaluar la actividad celular utilizando un modelo de Caco-2, la bioactividad de las fracciones digeridas fue comparable a los alimentos no digeridos a una misma concentración de polifenoles totales. Esto estaría sugiriendo que los cambios cualitativos y cuantitativos en el perfil de polifenoles de la uva y vino, como consecuencia de la digestión gastrointestinal, no modifican la bioactividad de los alimentos. Los ácidos fenólicos, además de la quercetina, fueron los polifenoles más resistentes a la digestión, por lo que serían los polifenoles más relevantes para explicar la actividad biológica de uvas y vinos blancos digeridos.

6. BIBLIOGRAFIA

A

- Ablajan, K., Abliz, Z., Shang, X-Y., He, J-M., Zhang, R-P., & Shi, J-G. (2006). Structural characterization of flavonol 3,7-di-O-glycosides and determination of the glycosylation position by using negative ion electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 41, 352-360.
- Alvarado, A. C. & Mendoza, L. M. 2002. Posibles efectos citotóxicos de sustancias aisladas de diferentes especies vegetales colombianas. Microbióloga industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología Industrial. Bogotá. 89 p.
- Arenas, E. H., & Trinidad, T. P. (2017). Fate of polyphenols in pilim (*Canarium ovatum* Engl.) pomace after in vitro simulated digestion. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7, 53–58.
- Arts, M. J. T. J., Sebastiaan Dallinga, J., Voss, H.-P., Haenen, G. R. M. M., & Bast, A. (2003). A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. *Food Chemistry*, 80, 409–414.
- Ávalos García, A., & Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2, 119-145.

B

- Baiano A., Gambacorta G., Terracone C., Previtali M.A., Lamacchia C., La Notte A. (2009). Changes in Phenolic Content and Antioxidant Activity of Italian Extra Virgin Olive Oils during Storage. *Journal of Food Science* 74(2):C177-83
- Barcia, M. T., Pertuzatti, P. B., Rodrigues, 549 D., Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I., & Godoy, H. T. (2014). Occurrence of low molecular weight phenolics in *Vitis vinifera* red grape cultivars and their winemaking by-products from São Paulo (Brazil). *Food Research International*, 62, 500-513.
- Baur, J. A., & Sinclair, D. A. (2006). Therapeutic Potential of Resveratrol: The In Vivo Evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 493-506.

- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Bouayed, J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128, 14–21.
- Boyer, J., Brown, D., and Liu, R.H. 2004. Uptake of quecentin and quercetin 3glucoside Form whole onion and apple peel extracts by caco-2 cell monolayers. *J. Agric Food Chem*: 52, 7172-7179.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Bruneton, J. (1993). *Farmacognosia: Fitoquímica y Plantas Medicinales* (2ª Edición ed.). (A. Villar del Fresno, E. Carretero Accame, & M. Rebuelta Lizabe, Trads.) Madrid, Madrid, España: Editorial ACRIBIA S.A.
- Burgos-Edwards, A., Jiménez-Aspee, F., Thomas-Valdés, S., Schmeda-Hirschmann, G., & Theoduloz, C. (2017). Qualitative and quantitative changes in polyphenol composition and bioactivity of *Ribes magellanicum* and *R. punctatum* after in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 237, 1073–1082.

C

- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
- Casares Faulín, A. B. (2010). *Análisis de polifenoles en los vinos mediante técnicas de separación*. Universidad Politécnica de Catalunya.
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). Flavonol profiles of vitis vinífera red grapes and their single-cultivar wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 992-1002.

- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Gómez, M. V., Velders, A. H., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2009). Flavonol 3-*O*-Glycosides Series of *Vitis vinifera* Cv. Petit Verdot Red Wine Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 209-219.
- Celep. E., Charehsaz, M., Akyüz, S., Türköz Acar, E., & Yesilada, E. (2015). Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on the bioavailability of phenolic components and the antioxidant potentials of some Turkish fruit wines. *Food Research International*, 78, 209-215.
- Chaves, M. M., Zarrouk, O., Francisco, R., Costa, J. M., Santos, T., Regalado, A.P., Rodrigues, M. L., & Lopez, C. M. (2010). Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data. *Annals of Botany*, 105, 661-676.
- Cilla, A., González-Sarriás, A., Tomás-Barberán, F. A., Espín, J. C., & Barberá, R. (2009). Availability of polyphenols in fruit beverages subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion and their effects on proliferation, cell-cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. *Food Chemistry*, 114, 813-820.
- Clifford, M. N. (2004). Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Medica*, 70, 1103-1114.
- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A. C. P., Tavares, R. M., Sousa, M. J., Agasse, A., Delrot, S., & Gerós, H. (2007). Biochemical Changes throughout Grape Berry Development and Fruit and Wine Quality. *Food*, 1, 1-22
- Cordero, C. C. 2002. Implementación de un método *in vitro* de evaluación preliminar de actividad anticancer de extractos vegetales empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. Tesis pregrado. Universidad Nacional de Colombia. Química Farmacéutica.
- Costa, C., Tsatsakis, A., Mamoulakis, C., Teodoro, M., Briguglio, G., Caruso, E., ... Fenga, C. (2017). Current evidence on the effect of dietary polyphenols intake on chronic diseases. *Food and Chemical Toxicology*, 110, 286–299.
- Crespo, M. B. (2002). Biodisponibilidad de calcio, hierro y cinc en leguminosas mediante ensayos *in vitro* con cultivos celulares. [Tesis doctoral en farmacia]. Universidad de Valencia. Valencia, España.
- Criqui, M. H., & Ringel, B. L. (1994). Does diet Does diet or alcohol explain the French paradox?. *Lancet*, 344, 1719-1723.

D

- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., & Massella R. (2010). Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 1321-1342.
- Derradji-Benmeziane, F., Djamai, R., & Cadot, Y. (2014). Antioxidant capacity, total phenolic, carotenoid, and vitamin C contents of five table grape varieties from Algeria and their correlations. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 48, 153–162.
- Downey, M. O., & Rochfort, S. (2008). Simultaneous separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectral identification of anthocyanins and flavonols in Shiraz grape skin. *Journal of Chromatography A*, 1201, 43-47.

F

- Fogh, J., Fogh, J. M., and Orfeo, T. 1977. One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing in nude mice. *J. Natl Cancer Instit*: 59, 221-226.
- Foti, M. C., Daquino, C., Geraci, C. (2004). Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH• radical in alcoholic solutions. *Journal of Organic Chemistry*, 69, 2309-2314.
- Franco-Bañuelos, A., Contreras-Martínez, C. S., Carranza-Téllez, J., & Carranza-Concha, J. (2017). Total phenolic content and antioxidant capacity of non-native wine grapes grown in Zacatecas, Mexico. *Agrociencia*, 51, 661–671.
- Freshney, R. I. 2000. *Culture of animal cell. A manual of basic technique*. Cuarta edición. John Wiley and Sons Inc. New York.
- Freshney, R. I. 1995. *Animal cell culture. A practical approach*. Oxford University Press.

G

- Garbetta, A., Nicassio, L., D'Antuono, I., Cardinali, A., Linsalata, V., Attolico, G., & Minervini, F. (2018). Influence of in vitro digestion process on polyphenolic profile of skin grape (cv. Italia) and on antioxidant activity in basal or stressed conditions of human intestinal cell line (HT-29). *Food Research International*, 106, 878–884.
- Garrido, J., & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols- A chemical perspective. *Food Research International*, 54, 1844-1858.
- Garret, D., Failla, M., and Sarama, R. 2000. Estimation of carotenoid bioavailability from fresh stir-fried vegetables using an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *J.Nutr. Biochem*:11, 574-580.
- Gaté, L., Paul, J., Nguyen Ba, G., Tew, K. D., & Tapiero, H. (1999). Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 53, 169-180.
- Gimeno, M. A. (2006). Guía de Identificación y Trazabilidad de Vinos Argentinos. 1º edición.
- Ginjom, I., D'Arcy, B., Caffin, N., & Gidley, M. (2011). Phenolic compound profiles in selected Queensland red wines at all stages of wine-making process. *Food Chemistry*, 125, 823-834.
- Gronbaek, M., Becker, U., Johansen D., Gottschau, A., Schnohr, P., Ole Hein, H., Jensen, G., & Sørensen, T. I. A. (2000). Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease, and cancer. *Annals of Internal Medicine*, 133, 411-419.
- Guyton, A.C., and Hall, J.E. 2001. Tratado de fisiología médica. McGraw Hill.-10 edición. Madrid, España. 815pp.
- Gumienna, M., Lasik, M., & Czarnecki, Z. (2011). Bioconversion of grape and chokeberry wine polyphenols during simulated gastrointestinal in vitro digestion. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62, 226–233.

H

- Halliwell, B. (1995). Antioxidant characterization; methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 49, 1341-1348.
- Herold, G., Besemer, F., and Rogler, D., 1994. *Morphology of caco-2 cells varies in different batches. In Vitro Cell Dev Biol Anim*: 30A, 289-291.
- Hirawan R., YuinSer W., Arntfield S., Beta T. (2010). Antioxidant properties of commercial, regular- and whole-wheat spaghetti. *Food Chemistry*, 119, 1
- Hu, J.-L., Nie, S.-P., Min, F.-F., & Xie, M.-Y. (2013). Artificial simulated saliva, gastric and intestinal digestion of polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L. *Carbohydrate Polymers*, 92, 1143-1150.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125, 1-12.

I

- INV (2015). *Instituto Nacional de Vitivinicultura*. Disponible desde: <http://www.inv.gov.ar/index.php/informes-anuales>
- Ivanova, V., Dörnyei, A., Márk, L., Vojnoski, B., Stafilov, T., Stefova, M., & Kilár, F. (2011). Polyphenolic content of Vranec wines produced by different vinification conditions. *Food Chemistry*, 124, 316-325.

K

- Kammerer, D., Claus, A., Carle, R., & Schieber, A. (2004). Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4360-4367.
- Kinsella, J. E., Frankel, E. N., German, J. B., & Kanner, J. (1993). Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology*, 47, 85-89.

Korenika, A. M. J., Žulj, M. M., Puhelek, I., Plavša, T., & Jeromel, A. (2014). Study of phenolic composition and antioxidant capacity of Croatian macerated white wines. *Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe und Wein, Obstbau und Fruchteverwertung*, 64, 171–180.

L

Lijavetzky, D., Ruiz-García, L., Cabezas, J. A., De Andrés, M. T., Bravo, G., Ibáñez, A., Carreño, J., Cabello, F., Ibáñez, J., & Martínez-Zapater J. (2006). Molecular genetics of berry colour variation in table grape. *Molecular Genetics and Genomics*, 276, 427-435.

Limón-Pacheco, J., & Gonsebatt, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research*, 674, 137-147.

Lingua, M., Fabani, P., Wunderlin, D., & Baroni, V. (2016). From grape to wine: Changes in phenolic composition and its influence on antioxidant activity. *Food Chemistry*, 208, 228-238.

Lingua, M. S., Wunderlin, D. A., & Baroni, M. V. (2018). Effect of simulated digestion on the phenolic components of red grapes and their corresponding wines. *Journal of Functional Foods*, 44, 86–94.

Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 134, 3479S-3485S.

Liu, R. H., & Finley, J. (2005). Potential cell culture models for antioxidant research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4311-4314.

Lobo, V., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals and functional foods: impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4, 118-126.

Lunte, S. M., Blankenship, K. D., & Read, S. A. (1988). Detection and Identification of Procyanidins and Flavanols in Wine by Dual-Electrode Liquid Chromatography-Electrochemistry. *Analyst* (113), 99-102.

Lushchak, V. I. (2011). Adaptative response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 153, 175-190.

M

- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. F. C. (2008). Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613, 1-19.
- Manach C., Williamson G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 230- 242.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727- 747.
- McDougall, G. J., Fyffe, S., Dobson, P., & Stewart, D. (2005). Anthocyanins from red wine - Their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 66, 2540-2548.
- Menéndez, P. 2012. Vinos de Argentina y el mundo: vitivinicultura, variedades y estilos de vinos. Editorial Aguilar Colección. Buenos Aires, 960 pp.
- Mitić, M. N., Obradović, M. V., Grahovac, Z. B., & Pavlović, A. N. (2010). Antioxidant capacities and phenolic levels of different varieties of Serbian white wines. *Molecules*, 15, 2016–2027.
- Monagas, M., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2005). Updated Knowledge About the Presence of Phenolic Compounds in Wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 85-118.
- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Laureano, O., & da Silva, J. M. R. (2003). Monomeric, Oligomeric, and Polymeric Flavan-3-ol Composition of Wines and Grape from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6475-6481.
- Moon, J-K., & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1655-1666.
- Moore, R. D., & Pearson, T. A. (1986). Moderate alcohol consumption and coronary artery disease: A review. *Medicine*, 65, 242-267.

- Morgan D.M.L. (1998) Tetrazolium (MTT) Assay for Cellular Viability and Activity. In: Morgan D.M.L. (eds) Polyamine Protocols. Methods in Molecular Biology™, vol 79. Humana Press
- Morgan, S. J & Darling, D. C. 1995. Cultivo de células animales. Editorial Acribia, Zaragoza., España.
- Mossman, T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Immunol Methods* 65, 5 3.

N

- Neveu, V., Perez-Jiménez, J., Vos, F., Crespy, V., du Chaffaut, L., Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D., Scalbert, A., 2010. Phenol-explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. Database, doi: 10.1093/database/bap024 (version 1.5.2). Available at: <http://www.phenol-explorer.eu>.
- Niki, E., (2011). Antioxidant capacity: which capacity and how to assess it?. *Journal of Berry Research*, 1, 169-176.

P

- Pavan, V., Sancho, R. A. S., & Pastore, G. M. (2014). The effect of in vitro digestion on the antioxidant activity of fruit extracts (*Carica papaya*, *Artocarpus heterophyllus* and *Annona marcgravii*). *LWT- Food Science and Technology*, 59, 1247–1251.
- Pérez-Magariño, S., Revilla, I., González-SanJosé, M. L., & Beltrán, S. (1999). Various applications of liquid chromatography-mass spectrometry to the analysis of phenolic compounds. *Journal of Chromatography A*, 847, 75-81.
- Podsędek, A., Redzyna, M., Klewicka, E., & Koziolkiewicz, M. (2014). Matrix Effects on the Stability and Antioxidant Activity of Red Cabbage Anthocyanins under Simulated Gastrointestinal Digestion. *BioMed Research International*, 2-11.
- Ponce de León-Rodríguez MDC, Guyot JP, Laurent-Babot C. (2019) Intestinal in vitro cell culture models and their potential to study the effect of food components on intestinal inflammation. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 59(22):3648-3666

- Poudel, P. R., Tamura, H., Kataoka, I., & Mochioka, R. (2008). Phenolic compounds and antioxidant activities of skins and seeds of five wild grapes and two hybrids native to Japan. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 622-625.
- Pretorius, I.S. Nuevas variedades de vid adaptadas a la industria vinícola. The Australian Wine Research Institute. (2004). Adelaida, Australia. *Acenologia, Revista de Enología Científica y Profesional*. Nº 45.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82, 513-523.
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenolics as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3396-3402.

R

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237.
- Repetto, G & Repetto M. 1995. Métodos alternativos: estudios toxicológicos in vitro. Pags. 37-59 en: M. Repetto (ed). Toxicología Avanzada. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España.
- Rice-Evans, C. (2001). Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, 8, 797-807.
- Rockenbach, I. I., Rodrigues, E., Gonzaga, L. V., Caliari, V., Genovese, M. I., de Souza Schmidt Gonçalves, A. E., & Fett, R. (2011). Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food Chemistry*, 127, 174-179.
- Rousset, M., Trugnan, G., Zweibaum, A. (1986). Castanospermine: a potent inhibitor of sucrase from the human enterocyte-like cell line Caco-2.

- Rodríguez-Roque, M. J., Rojas-Graü, M. A., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2013). Changes in Vitamin C, Phenolic, and Carotenoid Profiles Throughout *in Vitro* Gastrointestinal Digestion of a Blended Fruit Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 1859-1867.
- Ruberto, G., Renda, A., Daquino, C., Amico, V., Spatafora, C., Tringali, C., & De Tommasi, N. (2007). Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chemistry*, 100, 203-210.

S

- Sanz-Buenhombre, M., Villanueva, S., Moro, C., Tomás-Cobos, L., Viadel, B., & Guadarrama, A. (2016). Bioavailability and the mechanism of action of a grape extract rich in polyphenols in cholesterol homeostasis. *Journal of Functional Foods*, 21, 178–185.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101, 492-501.
- Sen, S., & Chakraborty, R. (2011). The Role of Antioxidants in Human Health. En: S. Andreescu, M. Hepel (Eds.), *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*, ACS Symposium Series, Washington, pp. 1-37 (Chapter 1).
- Singleton, V. L., & Rossi J. A. J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Srinivasan, V. S. (2001). Bioavailability of nutrients: a practical approach to *in vitro* demonstration of the availability of nutrients in multivitamin-mineral combination products. *Journal of Nutrition*, 131, 1349S-1350S.
- Stasko, A., Brezova, V., Biskupic, S., & Misik, V. (2007). The potential pitfalls of using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl to characterize antioxidants in mixed water solvents. *Free Radical Research*, 41, 379-390.
- Steinberg, D. (1993). Modified forms of low-density lipoprotein and atherosclerosis. *Journal of Internal Medicine*, 233, 227-232.
- Sun, B., Neves, A. C., Fernandes, T. A., Fernandes, A. L., Mateus, N., De Freitas, V., Leandro, C., & Spranger, M. I. (2011). Evolution of phenolic composition of red

wine during vinification and storage and its contribution to wine sensory properties and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 6550-6557.

T

Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120.

U

Urquiaga I., Echeverría G., Dussailant C., Rigotti A. (2017). Origen, componentes y posibles mecanismos de acción de la dieta mediterránea. *Rev. méd. Chile* vol.145 no.1

V

Vanzo, A., Terdoslavich, M., Brandoni, A., Torres, A. M., Vrhovsek, U., & Passamonti, S. (2008). Uptake of grape anthocyanins into the rat kidney and the involvement of bilitranslocase. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52, 1106-1116.

Verardo V.,Gómez-Caravaca A.M., Messia A.C.,Marconi E.,Caboni M.F. (2011). Development of Functional Spaghetti Enriched in Bioactive Compounds Using Barley Coarse Fraction Obtained by Air Classification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(17):9127-34

W

Waterhouse, A.L.; Laurie, F. (2006) Oxidation of Wine Phenolics: A Critical Evaluation and Hypotheses. *Am J Enol Vitic.* 57: 306-313

Wolfe, K. L., & Liu, R. H. (2008). Structure-Activity Relationships of Flavonoids in the Cellular Antioxidant Activity Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8404-8411.

Y

Yamamoto, Y. Y. (2000). Free radicals in chemistry, biology and medicine. UK: OICA International.

Z

Zapata S, Piedrahita AM, Rojano B. Capacidad atrapadora de radicales oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia. *Perspect Nutr Humana*. 2014;16: 25-36.