

FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
TRABAJO FIN DE GRADO



UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

TÍTULO:

**POLIFENOLES DE LA UVA**

Autor: María Latorre Leal

D.N.I.: 72895353G

Tutor: Rafael Lozano Fernández

Convocatoria: Junio 2016

INDICE	
RESUMEN	2
ABSTRACT	2
1.INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	3
<u>1.1 VITIS VINIFERA L. Y SU IMPACTO EN LA SALUD</u>	3
<u>1.2 BENEFICIOS DEL CONSUMO DE VINO ASOCIADOS A LAS PROPIEDADES DE LA UVA.</u>	
<u>PARADOJA FRANCESA</u>	3
<u>1.3 ESTRUCTURA DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS</u>	4
<u>1.4 COMPOSICIÓN FENÓLICA DE LA UVA</u>	5
<u>1.5 RESIDUOS DE LA UVA</u>	6
<u>1.6 ACTIVIDAD BIOLÓGICA.</u>	6
<u>1.7 CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA DE LOS POLIFENOLES DE LA UVA Y ACTIVIDAD</u>	
<u>ANTIOXIDANTE.</u>	7
2.OBJETIVOS	8
3. METODOLOGÍA	8
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
<u>4.1 MÉTODOS CUANTITATIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD</u>	
<u>ANTIOXIDANTE</u>	10
<i>4.1.2 Medidas directas</i>	12
4.1.2.1 Reacciones SET y reacciones HAT	12
4.1.2.2.Oxidación de radicales.	12
4.1.2.3 Variantes más significativas de los métodos.	14
4.1.2.4 Oxidación de grasas	14
<i>4.1.3 Medidas indirectas. Cuantificación de polifenoles</i>	15
<u>4.2 IDENTIFICACIÓN Y SEPARACIÓN DE POLIFENOLES.</u>	15
<u>4.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA UVA Y SUBPRODUCTOS EN RELACIÓN CON SUS</u>	
<u>POLIFENOLES TOTALES</u>	16
5.CONCLUSIÓN	17
6. BIBLIOGRAFÍA	18

## **Resumen**

El interés sobre el estudio de los polifenoles presentes de forma natural tanto en la uva como en sus productos tras el procesado ha ido creciendo en los últimos años debido a sus propiedades beneficiosas para la salud. Un ejemplo de ello, sería lo que conocemos en la actualidad como “paradoja francesa”.

Dentro de la denominación de compuestos fenólicos, englobamos varios grupos con características estructurales comunes: flavonoides y no flavonoides. Los flavonoides se subdividen principalmente en flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonoles, flavan-3-oles, antocianinas, chalconas y dihidrochalconas. En cuanto a no flavonoides, pertenecen los fenoles sencillos y los estilbenos, que con frecuencia se encuentran esterificados a los flavonoides. La composición fenólica es variable en las distintas partes de la uva, focalizándose principalmente en las partes sólidas.

En cuanto a su actividad biológica, muchos son los estudios que certifican los beneficios para la salud. Centrándonos en la capacidad oxidante como objeto de estudio, revisaremos la metodología usada in vitro mediante oxidación de radicales (DPPH, TEAC(ABTS), ORAC) y de grasas (TBARS y oxidación de LDLs), junto el análisis de su composición fenólica total ( Ensayo de Folin-Ciocalteu) y el uso de técnicas instrumentales. Así como la relación entre variables de actividad y composición en uva y subproductos, teniendo como finalidad las posibles aplicaciones en la industria y estrategias terapéuticas futuras.

## **Abstract**

Interest on the study of polyphenols naturally present in both the grape and its products after processing has been growing in recent years due to its beneficial health properties. An example of this, would be what we know today as “French paradox”.

As phenolic compounds, we include several groups with common structural features: flavonoids and non-flavonoids. Flavonoids are divided into flavones, flavanones, isoflavones, flavonols, flavan-3-ols, anthocyanins, chalcones and dihydrochalcones. As no flavonoids, belong simple phenols and stilbene, which often are esterified to flavonoids. The phenolic composition varies in different parts of the grape, focusing mainly on the solid parts.

As for their biological activity, there are many studies confirming the health benefits. Focusing on the oxidizing ability as a study review, the methodology used in vitro by oxidation radical (DPPH, TEAC (ABTS), ORAC) and fat (TBARS and oxidation of

LDLs), with the analysis of total phenolic composition (Folin-Ciocalteu assay) and the use of instrumental techniques. And the relationship between activity and composition variables in grape and products, with the purpose of the potential applications in industry and future therapeutic strategies.

## **1.INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES**

### **1.1 Vitis vinifera L. y su impacto en la salud**

Tras estudios recientes que avalan la relación que se establece entre diversas patologías y el estrés oxidativo en el organismo, se ha generado una mayor atención a los antioxidantes de origen natural, como los polifenoles; que se pueden encontrar en los alimentos de nuestra dieta. La potencial toxicidad de compuestos fenólicos sintéticos como el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) y galato de propilo (GP) ha dado lugar a un interés por estos compuestos naturales, que además se les atribuyen propiedades antivirales, antimicrobianas y antiinflamatorias. (1)

No hay duda de que las uvas constituyen uno de los cultivos de frutas más abundantes, siendo la *Vitis vinifera* L. comúnmente cultivada para la producción de vinos de todo el mundo. Especial atención se ha prestado a las uvas por su alto contenido en compuestos fenólicos (principalmente en la piel y semillas) así como en los subproductos tras su procesado, ya que desempeñan un papel importante en la enología, debido a su influencia sobre algunas propiedades sensoriales importantes de uvas y vinos, como el color, la estabilidad, la amargura y la astringencia.(2,3)

### **1.2 Beneficios del consumo de vino asociados a las propiedades de la uva. Paradoja francesa**

Cabe destacar las propiedades antioxidantes asociadas con diversos efectos fisiológicos beneficiosos que se derivan del consumo moderado de vino.

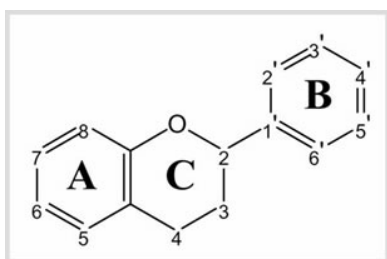
En las Guías Alimentarias de 2015-2020 para los Estadounidenses se define como recomendación el consumo una bebida al día para las mujeres y hasta dos bebidas para los hombres (4). Algunos estudios epidemiológicos han encontrado que el consumo moderado de vino se asocia con un menor riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV) y un menor riesgo de mortalidad entre los adultos de mediana edad y de edad avanzada. El

interés en los efectos del vino ha ido creciendo exponencialmente desde la década de 1990, lo que confirma que en general, especialmente el vino tinto, puede encerrar algunos compuestos saludables, además de su contenido de alcohol. Esta ventaja específica del vino ha sido apoyada por observaciones como la tasa de mortalidad cardiovascular más baja en Francia en comparación con otros países con un consumo similar de grasas saturadas, la denominada "paradoja francesa". Se hace referencia a "paradoja francesa", al hecho de que en ciertas regiones de Francia, la incidencia entre sus habitantes de enfermedades coronarias es inferior a la que se registra en los Estados Unidos, a pesar de que el consumo de grasas saturadas en sus respectivas dietas son muy similares. Dicho consumo de grasas está considerado como un factor de riesgo en la incidencia de procesos coronarios. Una de las posibles explicaciones a este fenómeno y por el cual adquiere gran interés como objeto de estudio, es la de atribuir el papel de antioxidantes a los compuestos fenólicos presentes en los vinos como un factor de prevención tras su consumo rutinario, evitando procesos oxidativos sobre las LDL, y la inhibición de la agregación plaquetaria en enfermedades coronarias. (5)

### 1.3 Estructura de los compuestos fenólicos

El término fenoles comprende aproximadamente 8000 compuestos que aparecen en la naturaleza. Todos ellos poseen una estructura común: un anillo fenol, es decir, un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo.

Los **flavonoides** son los polifenoles que poseen al menos 2 subunidades fenólicas; los compuestos que tienen 3 o más subunidades fenólicas se denominan **taninos**.



**Figura 1.** Estructura básica de los flavonoides

Los flavonoides son unos derivados hidroxilados, metoxilados y glicosilados del 2 fenil benzo [ $\alpha$ ] pirano (6). En base a su estructura, los flavonoides se subdividen en ocho grupos principales: **flavonas**, **flavanonas**, **isoflavonas**, **flavonoles**, **flavan-3-oles**,

**antocianinas, chalconas y dihidrochalconas.** Comprenden alrededor de 4000 compuestos identificados.

Además del grupo de flavonoides, existen otros compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes pero que no mantienen la estructura del 2 fenil benzo [ $\alpha$ ] pirano como son los **fenoles sencillos** (ácidos benzoicos, ácidos cinámicos) y los **estilbenos** (resveratrol, piceatanol). Con frecuencia aparecerán esterificando a los flavonoides (7).

#### **1.4 Composición fenólica de la uva**

Los compuestos fenólicos de la uva se localizan mayoritariamente en las partes sólidas: piel, semilla y tejido vascular. En la **pulpa** destaca la presencia de **ácidos fenólicos y sus derivados**. Los **flavonoles y antocianos** se encuentran localizados en las células del **hollejo** de la uva. A diferencia de los flavonoles presentes en uva blanca y tinta, los **antocianos** se encuentran únicamente en la piel de la uva tinta siendo responsables del color rojo característico de estos vinos. Los **flavan-3-oles** se localizan en las **semillas** de las uvas. En el grupo de flavan-3-oles incluye monómeros y también oligómeros, perteneciendo a estos últimos las **procianidinas**, presentes en la semilla. En los **vinos blancos** los fenoles mayoritarios son aquellos procedentes de la **pulpa**, mientras que en los **tintos**, la maceración alcohólica de los **hollejos** y las **semillas** permite la liberación y solubilización en el vino.

Los más abundantes compuestos fenólicos no coloreados en **piel** son **flavan-3-oles** en forma monómero serían tales como la **catequina** y **epicatequina**, así como en oligómeros, formas poliméricas, también llamados **proantocianidinas o taninos condensados**, están presentes principalmente en las **semillas** de uva. Estos compuestos pueden contener subunidades de **ácido gálico, epigallocatequina de galato** y de **epicatequina**.

Las **antocianinas** son los pigmentos principales de las uvas rojas ubicadas en la **piel**; aparecen durante el proceso maduración, siendo las principales responsables del color del vino tinto. Las principales antocianinas que se encuentran en las uvas se derivan de **cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina y malvidina**, y por lo general se producen como glicósidos y acilglicósidos; **malvidina-3-O-glucósido** es el más abundante (8).

### **1.5 Residuos de la uva**

Los tipos de residuos de uva producidos están estrechamente relacionados con los procedimientos llevados a cabo en la vinificación. El mayor porcentaje de residuos obtenidos en la elaboración está representado por: **residuos orgánicos** (que contienen los residuos de la prensa/orujo, pulpa de uva, semillas, pieles, tallos y hojas).

Los principales residuos del proceso de vinificación son los **hollejos** formados por la piel, pulpa y semilla de uva, que se obtienen después de prensar el mosto, y los **tallos y hojas**, que se separan previamente de las uvas en una etapa de despallado.

El tercer grupo de residuos de vinificación lo forman las **lías de fermentación**, un precipitado que aparece en el vino formado por las levaduras, que se depositan al fondo al terminar el proceso de fermentación, y otros compuestos insolubles en alcohol (tartratos, etc.) (9)

### **1.6 Actividad biológica.**

Nadie duda en la actualidad de la relevancia e implicación que tiene la nutrición en nuestra vida diaria siendo los componentes de los alimentos uno de los puntos de interés, actuando positiva o negativamente en la salud humana. Un ejemplo de ello sería el papel de los polifenoles en procesos oxidativos de nuestro organismo.

Las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) son especies químicas radicales y no radicales que debido a su inestabilidad se comportan como agentes oxidantes.

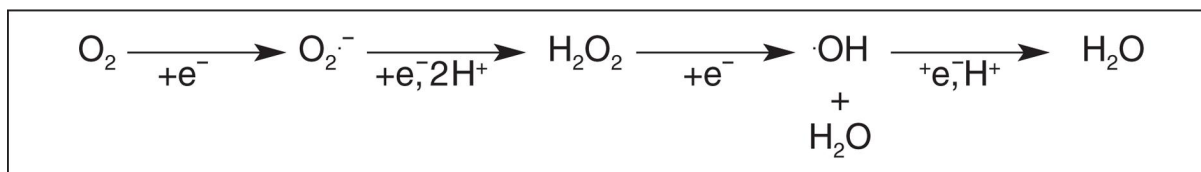
El origen de las ROS puede ser endógeno o también provenir de fuentes externas (tabaco, contaminación, medicamentos, etc). Aquellas que son endógenas están relacionadas con el metabolismo del oxígeno y con distintas reacciones de defensa de nuestro organismo, que comprenden sistemas enzimáticos y no enzimáticos; con la finalidad de mantener un equilibrio oxidativo. (10)

Las consecuencias de la formación de radicales libres en nuestro organismo son las siguientes:

- a) Uniones covalentes a macromoléculas celulares.
- b) Escisión de las cadenas de ADN.
- c) Generación de radicales oxígeno.
- d) Procesos de peroxidación lipídica.

Centrando nuestro interés en los dos últimos puntos:

- **Generación de radicales oxígeno.** La producción de radicales oxígeno son a partir del oxígeno molecular por sucesivos procesos de reducción monoelectrónica. El radical hidroxilo (OH\*) formado, por su alta capacidad reactiva interviene en procesos que alteran el equilibrio prooxidante/ antioxidante desplazándose hacia estados más oxidados en sistemas biológicos, reflejándose en alteraciones fisiológicas.



- **Procesos de peroxidación lipídica.** Los radicales en presencia de oxígeno pueden sustraer un átomo de hidrógeno de una molécula lipídica lo que conduce a la formación de hidroxiperóxidos lipídicos, alterando las membranas celulares, además de producir otros productos de degradación potencialmente tóxicos del tipo dialdehído malónico. (5)

Todos estos mecanismos descompensantes de oxidación en nuestro organismo tienen una relación directa con el envejecimiento celular y ciertas patologías como obesidad, hipercolesterolemia, enfermedades cardiovasculares, diabetes, Alzheimer, osteoporosis e hipertensión. Muchos son los estudios que relacionan el papel antioxidante de los polifenoles de la uva con la prevención o mejora de dichas alteraciones (11,12,13,14,15).

### 1.7 Caracterización analítica de los polifenoles de la uva y actividad antioxidante.

Una vez revisados distintos enfoques de la uva, nos centraremos de manera más específica en la parte analítica con el fin de establecer conclusiones sobre la caracterización química y poder antioxidante de estos compuestos mediante métodos basados en la oxidación de radicales como ORAC, DPPH y TEAC (ABTS) o aquellos basados en la oxidación de grasas (TBA-RS y oxidación de LDL). Ambos se combinan con el Ensayo de Folin-Ciocalteu que permite cuantificar los polifenoles totales. Las técnicas instrumentales más empleadas para separar, cuantificar e identificar los compuestos fenólicos son el HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución), UHPLC (Cromatografía Líquida de



Ultra alta Presión) y GC (Cromatografía de Gases), con la posibilidad de acoplarse a la espectrometría de masa (MS).

## **2.OBJETIVOS**

- Objetivo principal:
  - Realizar una revisión de la metodología necesaria para poder evaluar las propiedades antioxidantes y caracterización química de los compuestos fenólicos contenidos en la uva y sus residuos mediante técnicas analíticas, junto con métodos de procesado de extracción y purificación para dicho análisis.
- Objetivos secundarios:
  - Mejorar el conocimiento cuantitativo y cualitativo del perfil de la uva y subproductos residuales.
  - Promover la relevancia de la recuperación de componentes valorizables procedentes de los residuos generados en la industria enológica mediante la aplicación de los avances tecnológicos.
  - Establecer una mayor atención a los antioxidantes que, de forma natural, se pueden encontrar en los alimentos, y en concreto en la uva, como fuente beneficiosa para la salud ya sea en el tratamiento y prevención de patologías, así como su uso en productos nutracéuticos, cosméticos u otras aplicaciones en la industria.

## **3. METODOLOGÍA**

Basada en la revisión bibliográfica mediante el uso de plataformas de bases de datos tales como Pubmed, Pubchem, PhenolExplorer, Sciencedirect y Web of Science permitiendo seleccionar artículos atendiendo a fecha de publicación, índice de impacto e idioma, inglés, italiano o español y biblioteca virtual de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, así como informes de organismos oficiales y sociedades científicas; Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), CORDIS (Community Research and Development Information Service) y Federación americana de Alimentos y Medicamentos (U.S. Food and Drug Administration, FDA). Se ha permitido la consulta de plataformas y Procedimientos Normalizados de Trabajo pertenecientes a la empresa Natac Biotech asociada al Parque Científico de Madrid para

un mayor conocimiento y familiarización en la metodología usada en el procesado y análisis de extractos naturales a base de uva.

Así como la información aportada sobre posibles aplicaciones terapéuticas de los polifenoles de la uva e instrumentación analítica por el Departamento de Biología Molecular y Espectrometría de Masas de la Università degli Studi di Milano.

Entre otras las palabras clave para la búsqueda se encuentran “polyphenols”, “grape”, “wine”, “Vitis vinifera L.”, “antioxidant activity”, “ methods” , “ residues of grape” , “assay”.

#### **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Mediante la revisión de una serie de métodos y pruebas analíticas que se disponen en la actualidad, permite en nuestro trabajo enjuiciar aspectos fundamentales con criterio científico sobre la aceptabilidad de conclusiones sobre los polifenoles de la uva de manera correcta y precisa.

Debemos mencionar que antes de realizar el análisis de compuestos bioactivos es necesario extraer los compuestos fenólicos de la matriz sólida en la que se encuentran. Serán estas disoluciones que contienen los compuestos extraídos las que se analizan.

En general, este proceso se basa en una extracción sólido/líquido con disolventes orgánicos o la mezcla de algunos de ellos en relativa proporción (metanol, etanol, agua, acetato de etilo, propanol, acetona, dimetilformamida) obteniéndose en el extracto una mezcla de diferentes compuestos polifenólicos según su estudio de interés. El uso de este tipo de disolventes en las extracciones convencionales requiere una etapa final de purificación, siendo frecuente técnicas como la filtración o centrifugación.

Además de los disolventes, el tiempo de extracción es determinante a la hora de obtener un mayor rendimiento ya que largos períodos pueden generar oxidaciones y en ocasiones es necesario minimizarlas con el uso de agentes reductores (16); siendo de uso frecuente el dióxido de azufre (su contenido está regulado por la autoridades pertinentes debido a efectos nocivos para la salud en dosis elevadas) (17). Es posible la extracción mediante métodos no convencionales, como la extracción asistida con ultrasonidos con el fin de aumentar la penetración del disolvente en matrices celulares y el transferencia del material de interés, siempre y cuando se tenga mantengan valores de frecuencia óptimos

para su reproducibilidad. (18) Por lo tanto, no hay una única condición de extracción óptima o procedimiento para todos los tipos de residuos derivados de esta actividad.

---

#### 4.1 Métodos cuantitativos de la determinación de la actividad antioxidante.

##### 4.1.2 Medidas directas

###### 4.1.2.1 Reacciones SET Y HAT

###### 4.1.2.2 Oxidación de radicales

- DPPH
- TEAC
- ORAC

###### 4.1.2.3 Variantes más significativas de los métodos

###### 4.1.2.4 Oxidación de grasas

- Oxidación de LDLs
- TBARS

##### 4.1.3 Medidas indirectas. Cuantificación de polifenoles

- Folin-Ciocalteu. Polifenoles totales.

#### 4.2 Identificación y separación de polifenoles.

#### 4.3 Determinación de actividad antioxidante en vinos y relación con composición fenólica.

---

### **4.1 Métodos cuantitativos de la determinación de la actividad antioxidante**

La base de estos métodos consiste en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato susceptible de ser oxidado, de modo que el daño en presencia de un antioxidante es inhibido o reducido. Los ensayos miden la proporcionalidad de esta inhibición a la actividad antioxidante del compuesto o la muestra o también pueden basarse en cuantificar los productos formados tras dicho proceso.

Los distintos métodos difieren en el agente oxidante, en el sustrato empleado, en la técnica instrumental utilizada, en la medida del punto final y posibles interacciones de la muestra con el medio de reacción.

En los estudios in vivo ya que la matriz en la que se encuentran y sobre la que ejercen su acción es diversa. Se debe considerar parámetros diversos a la metodología in vitro como el grado de absorción de los compuestos, los productos del metabolismo que generan y la actividad de los mismos ya que en ocasiones la actividad in vitro es baja, como en el caso de compuestos fenólicos poliméricos; que tras su metabolismo a compuestos fenólicos simples pueden tener elevada capacidad antioxidante del plasma. A pesar de ello, existen aspectos en estas medidas como el transporte y acción de los radicales en compartimentos celulares que siguen siendo desconocidos.

### **Metodología in vitro**

Centrándonos en aquellos métodos realizados in vitro que, a pesar de no reproducir totalmente la situación fisiológica de nuestro organismo y ser excluyentes del metabolismo y biodisponibilidad capaz de modificar la actividad de los compuestos antioxidante; permiten diferenciar la acción antioxidante en muestras de uva. Muchos de los ensayos con el fin de aproximarse a ellos, incluyen radicales presentes en los sistemas biológicos ( $O_2$ ,  $H_2O_2$ , ROO, OH) pero no siendo siempre posible una completa reproducibilidad in vivo. (19)

Se han planteado una serie de condiciones que debería reunir un procedimiento estandarizado de medida de capacidad antioxidante in vitro entre las que destacan:

- Evaluar reacciones de transferencia de electrones y de átomo de hidrógeno.
- Especificar el sustrato de oxidación.
- Asegurar que el sustrato y el modo de inducir la oxidación son relevantes como fuentes de daño oxidativo.
- Ser sencillo.
- Poseer una instrumentación más o menos disponible.
- Tener una buena reproducibilidad.
- Ser adaptable para medir antioxidante hidrofílicos y lipofílicos.
- Ser adaptable para análisis rutinarios a gran escala.

En la actualidad, no hay un método que cumpla la totalidad de las condiciones, de manera que se usa una metodología combinada. (20)

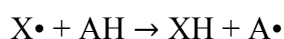
#### 4.1.2 Medidas directas

Englobamos dentro de medidas directas todas aquellas basadas en el uso de un sustrato susceptible de ser oxidado, un compuesto que actúa como oxidante y otro como antioxidante capaz de reducir la oxidación del sustrato mediante su propia oxidación. Centrándose en este fundamento, es en este punto donde los polifenoles de la uva desenvuelven su papel principal como antioxidantes.

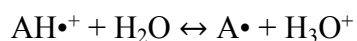
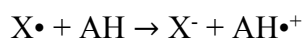
##### 4.1.2.1 Reacciones SET y reacciones HAT

El mecanismo de acción antioxidante de los polifenoles se basa en su capacidad para detener el proceso en cadena de oxidación lipídica (chain-breaking) mediante la reacción directa con los radicales libres. Puede llevarse a cabo por dos vías: **reacciones de transferencia de un átomo de H** (Hydrogen Atom Transfer, **HAT**) o de **transferencia de un electrón** (Single Electron Transfer, **ET**).

En las **reacciones HAT**,  $X\cdot$  sería el radical libre y AH el antioxidante, de forma que tras ceder un átomo de Hidrógeno por el antioxidante el radical formado es mucho más estable.



Por el contrario, en las **reacciones SET** el antioxidante transfiere un electrón para reducir un compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales, y serían reacciones en las que de nuevo  $X\cdot$  el radical libre y AH el antioxidante, reaccionando de la siguiente manera:



##### 4.1.2.2. Oxidación de radicales.

###### -DPPH (radical 2,2difetil-1-picrilhidrazil)

En este método se sitúa el DPPH $\cdot$ , un radical orgánico, en presencia del antioxidante y se ve en qué grado es capturado, lo que produce un descenso de la absorbancia a 515 nm.

El mecanismo de reacción fundamentalmente es SET. Este método fue modificado por Sánchez-Moreno et al. (1998), que introdujo parámetros cinéticos: la **EC50** (expresada en mol compuesto/mol DPPH), que es la cantidad de antioxidante necesaria para reducir en un 50% la cantidad inicial de radical; el **tEC50**, que es el tiempo necesario que necesita esa concentración para reducir en un 50% la cantidad inicial de

radical y la eficiencia antirradic lica  $AE = 1/(EC50 * tEC50)$ , que tiene en cuenta los dos factores. Cuanto mayor sea AE, el antioxidante ejercerá su acci3n con menos concentraci3n y en menos tiempo, lo que interesa en sistemas biol3gicos. (18)

**-TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) o ABTS ( cido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulf3nico).**

Se trata de una reacci3n tipo SET, basada en la capacidad de los antioxidantes, en nuestro caso, los polifenoles, para captar el radical cati3nico ABTS•+ ( cido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulf3nico), produciendo un descenso en la absorbancia a 658 nm. Se establece una comparaci3n entre el descenso de Trolox con el antioxidante a analizar.

El mecanismo implicado en generar dicho radical puede ser de manera enzimática con mioglobina o peroxidasa de rábano; químicamente con reactivos como  $MnO_2$ ,  $K_2S_2O_8$  o con el radical per3xido; electroquímicamente. No obstante, existen críticas a esta modificaci3n ya que se plantea una posible reacci3n de los polifenoles con el radical, generando otros compuestos a parte de la molécula original con la posibilidad de reaccionar con el radical, de modo que interfieren en la estequiometría de la reacci3n entre el ABTS y un compuesto o en las relaciones de estructura-actividad, ya que el cálculo no se podría basar en los moles de molécula no radicálica recuperados. También puede ocurrir que los compuestos polifen3licos forman aductos con el radical, por lo que no toda la pérdida de absorbancia se debería a que el radical volviera a su forma inicial; en este sentido, se ha observado la formaci3n de estructuras de este tipo entre el radical cati3nico y la catequina y el floroglucinol (22,23), siendo este último compuesto un derivado de degradaci3n de la catequina (7).

**-ORAC**

Basado en la medida de la disminuci3n de la fluorescencia de la proteína (fluoresceína) como resultado de la pérdida de su conformaci3n causado por una fuente de radicales per3xido (ROO) tras sufrir daño oxidativo. El método mide la capacidad de los antioxidantes en la muestra para proteger la proteína del proceso oxidativo. El mecanismo de la reacci3n se basa en la transferencia de un átomo de hidr3geno del antioxidante al radical libre. Por esto, se utiliza el radical iniciador, el AAPH, para generar el radical peroxil más estable  $ROO\cdot$ . La pérdida de fluorescencia de la FL es el indicador de la extensi3n de la oxidaci3n con el radical peroxil. En presencia de un antioxidante,  $ROO\cdot$  capta, preferiblemente, un átomo de hidr3geno del antioxidante estable.

Consecuentemente, no se verá alterada o en menor medida la fluorescencia de la molécula de fluoresceína.

-Los resultados tanto en el método ORAC como en TEAC se suelen expresar en equivalente Trolox ( $\mu\text{mol Trolox/g}$  o  $\mu\text{mol Trolox/L}$ ), un análogo hidrosoluble del alfa-tocoferol, universalmente empleado como estándar y óptimo para elaborar la curva de calibrado de este compuesto y curvas de comparación de ensayos de actividad antioxidante. (22,23)

#### **4.1.2.3 Variantes más significativas de los métodos.**

DPPH y TEAC (ABTS) emplea radicales ajenos al organismo a diferencia de ORAC que usa radicales peroxilo o hidroxilo, siendo estas ROS las más importantes a nivel fisiológico y por tanto de mayor significación. En la actualidad, existen variantes de éste método, como el método ORAC 5.0, con el fin de mejorar la reproducibilidad en el organismo con cinco fuentes diferentes de radicales libres (peroxilo, hidroxilo, peroxinitrito, superóxido y el oxígeno singlete). (24)

En cuanto a las medidas directas de actividad antioxidante del vino, hay que considerar la naturaleza de los compuestos fenólicos del vino, ya que algunos métodos sólo sirven para compuestos antioxidantes hidrosolubles.

En este sentido los mejores métodos para el vino serían ORAC o ABTS, que contemplan también compuestos solubles en mezclas hidroalcohólicas como es el vino.

#### **4.1.2.4 Oxidación de grasas**

##### **-Oxidación de LDLs**

Se caracteriza por ser una reacción de tipo HAT, en la cual se induce artificialmente la autooxidación con elementos como un iniciador azo o Cu(II) del ácido linoléico o LDL. El progreso de la auto-oxidación se controla por absorbancia UV a 234 nm, siendo esta longitud de onda la de máxima absorción en peróxidos de dieno conjugado de la oxidación del ácido linoleico. Normalmente, la solución de ensayo contiene el radical libre iniciador (AAPH [2,2'-azobis (2-amidinopropano)], sustrato (Ácido linoleico o LDL), antioxidante (en este caso, polifenoles de la uva) y el oxígeno disuelto. Ante la presencia de un iniciador, como el AAPH, comienza la reacción acumulándose óxidos de dienos conjugados. Tras ser añadido un antioxidante (polifenoles de la uva), se ve una disminución en la velocidad de la reacción, hasta ser consumido dicho antioxidante, punto

en el que la velocidad de reacción aumenta hasta el nivel desinhibido. La curva obtenida de la velocidad de oxidación es inversamente proporcional a la concentración de antioxidantes. La eficiencia antioxidante de una muestra, como definen varios autores, se obtiene de la pendiente de la curva.

#### **-TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Species)**

Se basa en la medida de la absorbancia a 532-35 nm. de un complejo cromógeno formado entre el ácido tiobarbitúrico y el malondialdehído (MDA), siendo éste un producto secundario de la oxidación lipídica, formado a partir de ácidos grasos poliinsaturados de al menos 3 enlaces. Cuanto más efectivos sean los antioxidantes presentes en la muestra, menor será la cantidad de MDA generado y, por tanto, la absorbancia medida.(20)

#### **4.1.3 Medidas indirectas. Cuantificación de polifenoles**

##### **- Ensayo de Folin-Ciocalteu. Polifenoles totales.**

Método colorimétrico descrito por Slinkard y Singleton (1977) usado para la cuantificación de Polifenoles totales, empleando el ácido gálico como estándar de referencia. Dicha cuantificación se determina mediante espectrofotometría UV/VIS. La reacción se mide por absorbancia UV a una longitud de onda de 760 nm. Los resultados se expresan en equivalentes de ácido gálico por volumen o masa, GAE.

Este ensayo utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu, que contiene una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico, solución de carbonato de sodio y el patrón.

Se trata de una reacción de reducción llevada a cabo en medio básico, apreciando una variación en la coloración de amarillo a azul, indicio del cambio en el estado de oxidación. Éste será mayor cuanto mayor sea el contenido en compuestos fenólicos.

En el análisis de subproductos del procesado de la uva, sus partes o de vinos blancos o tintos, en ocasiones es necesario diluir las muestras para realizar dicho ensayo. En aquellas muestras en las que se aplique un factor de dilución se debe tener en cuenta posteriormente en el cálculo de los polifenoles totales. (22,23)

#### **4.2 Identificación y separación de polifenoles.**

Las técnicas instrumentales para separar e identificar los compuestos fenólicos se basan principalmente en métodos cromatográficos en función del tiempo de retención( $t_R$ ) (21), siendo necesaria la puesta a punto de un método para cada grupo de polifenoles. Estas técnicas tienen como ventaja la capacidad de distinguir entre moléculas isómeras,



herramienta útil en la diferenciación de compuestos fenólicos con actividades antioxidantes diversas. Las más empleadas son HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución) (25), UHPLC (Cromatografía Líquida de Ultra alta Presión) (26) y en menor medida por GC (Cromatografía de Gases) ya que se debe tener en cuenta la volatilidad de los compuestos a analizar junto con su derivatización (tratamiento previo por reacciones químicas) (1). Todas estas técnicas cromatográficas se pueden combinar con la espectrometría de masas (MS) que separa en función de su masa y carga (m/z). (17)

### **4.3 Actividad antioxidante de la uva y subproductos en relación con sus polifenoles totales**

Tras la revisión bibliográfica de estudios que determinan la actividad antioxidante y su composición fenólica total tanto en diversas partes de la uva como en vinos tintos y blancos; se obtienen una serie de resultados.

-**Vinos tintos y blancos** pertenecientes a diversas regiones y variedades (26,27,28) presentan una diversidad cuantitativa en su composición polifenólica total, siendo mayor en uva tinta que en la blanca, así como en su capacidad antioxidante presentando distintos valores según la metodología utilizada, varios estudios demuestran una correlación entre la actividad antioxidante y polifenoles totales obteniéndose coeficientes de correlación significativos. (8,28)

-En cuanto a las partes de la **uva y subproductos** con mayor contenido de polifenoles son la semilla, piel, hojas y tallos respectivamente (3,29) Se ha visto una correlación proporcional entre la actividad antioxidante y la polifenoles totales en la uva, presentando una mayor capacidad antioxidante aquellas partes que contienen un porcentaje más alto de polifenoles.

Es frecuente, en muchos estudios focalizar como objetivo la composición individualizada tanto cualitativa como cuantitativamente de la composición fenólica de la uva y sus productos ya que no todos los compuestos presentan la misma actividad antioxidante ni se encuentran en la misma proporcionalidad, permitiendo establecer posibles hipótesis como sería el sinergismo entre las moléculas o su proporcionalidad respecto a la totalidad de polifenoles.

## 5.CONCLUSIÓN

El estudio sobre la uva y sus productos ha ido aumentando exponencialmente a lo largo del tiempo tras demostrarse la presencia de unos compuestos bioactivos beneficiosos para la salud denominados polifenoles, siendo su actividad antioxidante una de sus principales actividades.

El progreso en métodos que permiten su extracción, cuantificación y caracterización como el estudio de su actividad antioxidante abre un nuevo enfoque en posibles alternativas terapéuticas y en la promoción de la salud.

Uvas y vinos presentan una gran variedad de compuestos fenólicos de muy diversas estructuras químicas y pesos moleculares, cuya cantidad total y la proporción en que aparecen dependen de una serie de factores, como la variedad de la uva, el área de producción, la añada, la climatología, las técnicas agrícolas, los métodos de vinificación, el procedimiento de prensado de la uva y el tiempo de fermentación del mosto con la piel y las semillas así como el método utilizado en el proceso de extracción y análisis de los polifenoles.

Para realizar el screening de actividad antioxidante de varios tipos de vino y subproductos de la uva, usamos una metodología combinada con el fin de contrarrestar la información obtenida, ya que en la actualidad no existe ningún método que reúna tales características y es difícil que llegue a ser posible evaluar la capacidad antioxidante de una muestra por un solo método y teniendo en cuenta que se trata de métodos *in vitro* ya que la actividad antioxidante de los polifenoles de la uva difiere de su efecto *in vivo*, debido a las transformaciones metabólicas que sufren los compuestos antioxidantes en el organismo y su biodisponibilidad, siendo posible un alto valor de actividad analizado con un método *in vitro* pero con baja reproducibilidad en el organismo.

En líneas generales, podemos concluir que existe una correlación entre las variables estudiadas de actividad antioxidante y polifenoles totales, a pesar de la dificultad en la comparación entre diversos estudios, ya que el uso de metodología para la determinación de la capacidad antioxidante es muy variada y no existe un consenso que determine cuál es la adecuada.

Los vinos tintos presentan actividades y concentraciones polifenólicas superiores a los blancos siendo variables estos valores según el método analítico empleado. En cuanto a las distintas partes de la uva, la semilla, la piel y las hojas, representan un mayor porcentaje de polifenoles totales respectivamente. A pesar de que ciertos compuestos

contribuyen más que otros en su papel como antioxidantes, sin embargo; dicha actividad antioxidante está más relacionada con el conjunto de fenoles que con algún compuesto de forma aislada, de ahí la focalización en la totalidad de los polifenoles. No existe un único compuesto polifenólico responsable mayoritariamente de la actividad antioxidante. Además, debemos considerar que se tratan de moléculas que se encuentran en extractos de plantas y cuyo origen de síntesis es protectora, de modo que puede haber un sinergismo entre dichas moléculas.

El descubrimiento de los beneficios de la uva en los últimos años ha favorecido el aprovechamiento de los productos generados tras su procesado prestando una mayor atención en las técnicas de extracción y separación, así como en la tecnología en instrumentos analíticos ya que tras estudiar las relaciones estructura-actividad de algunos polifenoles podrían ser útiles en nuevos targets de investigaciones científicas futuras como la síntesis y modificación de nuevas moléculas de polifenoles con determinadas funcionalidades.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

1. Andreu Navarro A. Nuevas metodologías analíticas para la determinación de antioxidantes alimentarios. Tesis doctoral. Córdoba: Universidad de Córdoba; 2011.
2. Brenes A., Viveros A., Hamorro S., Arija I. Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. *Animal Feed Science and Technology*. 2016; 211:1–17. Citado en: [www.elsevier.com/locate/anifeedsci](http://www.elsevier.com/locate/anifeedsci)
3. Francisco J. Barba, Zhenzhou Zhu, Mohamed Koubaa, Anderson S. Sant'Ana, Vibeke Orlien. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2016;49: 96-109. Citado en: <http://www.journals.elsevier.com/trends-in-food-science-and-technology>
4. U.S. Department of Health and Human Services and U.S. Department of Agriculture. 2015 – 2020 Dietary Guidelines for Americans. 8th Edition. 2015. Disponible en: <http://health.gov/dietaryguidelines/2015/guidelines/>.
5. Ortega Mata M. Los antioxidantes de los alimentos. En: Sanz Pérez B., coordinador. Alimentación y Salud. Monografía VI. Madrid; Real Academia de Farmacia; 2000. 186-236.

6. Paladino S. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinifera* L.). Tesis de maestría. Mendoza: Universidad de Cuyo; 2008.
7. Garrido J., Borges F. Wine and grape polyphenols. A chemical perspective. *Food Research International*. 2013; 54: 1844-1858. Disponible en: ScienceDirect.
8. Xia E-Q, Deng G-F, Guo Y-J, Li H-B. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *Int. J. Mol. Sci.* 2010;11: 622-646.
9. Teixeira A., Baenas N., Dominguez-Perles R., Barros A., Rosa E., Moreno D.A. et al. Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 2014;15: 15638-15678.
10. Fernández-Pachón M.S., Villaño D., Troncoso A.M., García-Parrilla M.C. Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. *ALAN [Internet]*. 2006 Jun [citado 2016 Apr 02] ; 56( 2 ): 110-122. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222006000200002&lng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222006000200002&lng=es).
11. Tomé-Carneiroa J., Visioli F. Polyphenol-based nutraceuticals for the prevention and treatment of cardiovascular disease: Review of human evidence. *Phytomedicine*. 2016; 000:1–30.
12. Pandey K.B., Rizvi S.I. Role of red grape polyphenols as antidiabetic agents. *Integr med res*. 2014; 3:19–125.
13. G.M. Pasinetti, Wang J., Ho L., Zhao W., Dubner L. Roles of resveratrol and other grape-derived polyphenols in Alzheimer's disease prevention and treatment. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2015;1852:1202–1208.
14. Kutleša Z., Mršić D.B. Wine and bone health: a review. *J Bone Miner Metab.* 2016; 34:11–22.
15. Helmut M. Hügel H.M., Jackson N., May B., Zhang A.L., Xue C.C. Polyphenol protection and treatment of hypertension. *Phytomedicine*. 2016;23(2) : 220–231. [ScienceDirect abstract]
16. Arranz Martínez S. Compuestos polifenólicos (Extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: Metodología para su determinación e identificación. Tesis doctoral. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2010.

17. García-Guzmán J.J, Hernández-Artiga M.P., Palacios-Ponce de León L., Bellido-Milla D. Selective methods for polyphenols and sulphur dioxide determination in wines. *Food Chemistry*. 2015; 182:47–54.
18. Cordis.europa.eu. CORDIS. Community Research and Development Information Service [base de datos]. Luxemburgo; cordis.europa.eu; 1994 [actualizada 2016-03-30, acceso 2016-05-15]. Disponible en: [http://cordis.europa.eu/project/rcn/80095\\_en.html](http://cordis.europa.eu/project/rcn/80095_en.html)
19. López-Alarcón C., Denicola A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *J Agric Food Chem*. 2005;53(6):1841-56.
20. Pérez Jiménez J. Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes. Efecto de la fibra antioxidante de uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos. Tesis Doctoral. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 2007.
21. Oroian M., Escriche I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*. 2015;74:10–36.
22. Nur Alam Md., Bristi N.J., Rafiqzaman Md. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013; 21(2):143–152.
23. Huang D., Ou B., Prior R.L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J Agric. Food Chem*. 2005; 53 (6):841–1856.
24. Nemzer B., Chang T., Xie Z., Pietrzkowski Z., Reyes T., Ou B. Decrease of free radical concentrations in humans following consumption of a high antioxidant capacity natural product. *Food Sci Nutr*. 2014; 2(6): 647–654.
25. Rubilar M., Pinelo M, Shene C, Sineiro J, Nuñez MJ. Separation and HPLC-MS identification of phenolic antioxidants from agricultural residues: almond hulls and grape pomace. *J Agric Food Chem*. 2007 Dec 12;55(25):10101-10109.
26. Anli R.E., Vural N. Antioxidant phenolic substances of turkish red wines from different wine regions. *Molecules*. 2004; 14: 289-297.
27. Luna Proheus J.M., Garan Taberner C., Negre A., March J., Martonell A. Composición fenólica y actividad antioxidante de variedades minoritarias de vid de la Islas Baleares. En: VII Foro mundial del vino. Gobierno de La Rioja, Consejería de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Madrid, 2010: pag.62.
28. De Beer D., Jourbert E., Gelderblan C.A.W., Manley M. Antioxidant activity of south african red and white wines: Free radical scavenging. *J. Agric. Food Chem*. 2003; 51: 902-

909.

**29.** Doshi P., Pandurang A., Banerjee K., Oulkar D. Phenolic compounds, antioxidant activity and insulinotropic effect of extracts prepared from grape (*Vitis vinifera L*) byproducts. J Food Sci Technol. 2015; 52(1): 181–190.