



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

POLIFENOLES DE LA UVA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. FACULTAD DE FARMACIA

MARÍA LATORRE LEAL

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 Vitis vinifera L. y su impacto en la salud. La relación que se establece entre **PATOLOGÍAS** como obesidad, hipertensión, diabetes u osteoporosis, y el **ESTRÉS OXIDATIVO** en el organismo \rightarrow mayor atención a **compuestos antioxidantes** como los **POLIFENOLES**, que se encuentran de **forma natural** en alimentos; siendo la **uva (Vitis vinifera L.)** una de las más estudiadas

- elevada **producción mundial**.
- papel que desempeñan estos compuestos en la **enología**.
- **propiedades sensoriales** (color, estabilidad, amargura y astringencia) así como **antioxidantes, antivirales, antimicrobianas y antiinflamatorias**.

1.2 Paradoja francesa.

- En ciertas regiones de Francia, la incidencia entre sus habitantes de **enfermedades coronarias es inferior** a la que se registra en los **E.E.U.U.**
- Consumo de **grasas saturadas** son muy **similares**.



Compuestos **fenólicos** presentes en los **vinos** actúan como **factor de prevención** tras su consumo rutinario



1.3 Estructura de los compuestos fenólicos

-Estructura común: un **anillo fenol**.

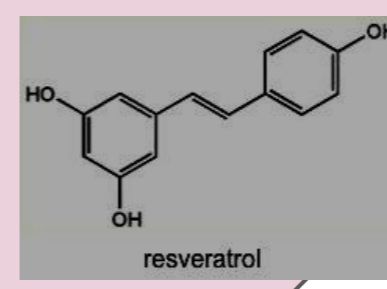
-**Flavonoides**: derivados del 2 fenil benzo [a] pirano (6).

En base a su estructura, se subdividen en: **flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonoles, flavan-3-oles, antocianinas, chalconas y dihidrochalconas.**

-**No flavonoides**, no mantienen la estructura como los **fenoles sencillos** (ácidos benzoicos, ácidos cinámicos) y los **estilbenos** (resveratrol, piceatanol). Con frecuencia aparecerán esterificando a los flavonoides.



Figura 1. Estructura básica de los flavonoides



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

1.4 Composición de la uva (mayoritariamente partes sólidas)

PIEL \rightarrow **Flavan-3-oles**, en forma de monómeros (Catequina y epicatequina).

\rightarrow **Antocianinas**; como glicósidos o acilglicósidos (siendo la más abundante **malvina-3-glucósido**) **RESPONSABLES DEL COLOR ROJO DE UVA TINTA.**

PULPA \rightarrow **Ác. fenólicos y derivados**

SEMILLA \rightarrow **Flavan-3-oles**: monómeros, oligómeros (OPCs) y polímeros (**características las proantocianidinas**)



Residuos de la uva. Principalmente residuos orgánicos estrechamente relacionados con la **vinificación**.

Los **hollejos** (piel, pulpa y semilla de uva); se obtienen después de **preparar el mosto**. Los **tallos y hojas**, que se separan previamente de las uvas en una etapa de **despallido**.

Las **lias de fermentación**, un precipitado formado por las levaduras y otros compuestos insolubles en alcohol (tartratos, etc)

2. OBJETIVOS

Objetivo principal:

-Revisión de la metodología necesaria para poder evaluar la **capacidad antioxidante** y **caracterización química** de los compuestos fenólicos contenidos en la uva y sus residuos mediante **técnicas analíticas**.



Objetivos secundarios:

- Conocimiento del perfil de la uva y subproductos.
- Promover la relevancia de la recuperación de componentes valorizables procedentes de la industria enológica.
- Mayor atención a los antioxidantes de la uva como fuente beneficiosa para la salud.

3. METODOLOGÍA

-Plataformas de bases de datos: **Pubmed, Pubchem, PhenolExplorer, Sciencedirect y Web of Science.**

-Informes de organismos oficiales y sociedades científicas: **CSIC CORDIS, FDA.**

-Plataformas y PNT de la empresa **Natac Biotech** para un mayor conocimiento y familiarización en la metodología usada en el procesado y análisis de extractos naturales a base de uva.



-Información sobre instrumentación analítica del **Departamento de Biología Molecular y Espectrometría de Masas de la Università degli Studi di Milano.**

Palabras clave: "polyphenols", "grape", "wine", "Vitis vinifera L.", "antioxidant activity", "methods", "assay".

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antes de realizar el análisis de compuestos bioactivos es necesario **EXTRAER** los compuestos fenólicos de la **matriz sólida** en la que se encuentran \rightarrow **Disoluciones a ANALIZAR**

Extracción **sólido/líquido CONVENCIONAL** con **disolventes orgánicos** o la mezcla de ellos (metanol, etanol, agua, acetato de etilo, propanol, acetona, dimetilformamida) obteniéndose en el extracto una mezcla de compuestos polifenólicos según su estudio de interés. El uso de estos disolventes REQUIERE etapa final de **purificación**, siendo frecuente la **filtración o centrifugación**.

Factores condicionantes: **disolventes, tiempo de extracción** (posibles oxidaciones---Uso de agentes reductores como **dióxido de azufre**).
Extracción asistida con **ULTRASONIDOS**--> aumentar la penetración del disolvente en matrices celulares y el trasfuerzo del material de interés.

4.1 Métodos cuantitativos de la determinación de la actividad antioxidante

Comprobar cómo un **AGENTE OXIDANTE** induce daño oxidativo a un **sustrato susceptible** de ser oxidado, de modo que 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 en cuantificar los productos formados.

-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.

Metodología in vitro \rightarrow Excluyen metabolismo y biodisponibilidad. Posible modificación de actividad antioxidante (ej. polifenoles poliméricos). **POSIBLE INCLUSIÓN** de radicales presentes en sistemas biológicos (O₂, H₂O₂, ROO, OH) No siempre completa **REPRODUCIBILIDAD**

Medidas directas. Basadas en la medida :

SUSTRATO OXIDABLE + OXIDANTE + ANTIOXIDANTE (POLIFENOLES)

- **Oxidación de radicales:** DPPH, TEAC(ABTS), ORAC.
- **Oxidación de grasas:** TBARS, OXIDACIÓN DE LDLS.

Reacciones SET y reacciones HAT

Mecanismo de acción de los polifenoles: capacidad para detener el proceso en cadena de oxidación lipídica (chain-breaking) mediante la reacción directa con los radicales libres.

REACCIONES HAT
 $X\cdot + AH \rightarrow XH + A\cdot$
Trasferencia de átomo H

REACCIONES SET (transf. electrónica)
 $X\cdot + AH \rightarrow X\cdot + AH\cdot+$
 $AH\cdot + H_2O \leftrightarrow A\cdot + H_3O+$
 $X\cdot + H_3O+ \rightarrow XH + H_2O$

Oxidación de radicales.

-DPPH(radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazil)

- Radical orgánico DPPH
- Mecanismo de reacción: **SET**
- En presencia de antioxidante \rightarrow **Descenso** de la absorbancia del radical a 515nm.
- Parámetros cinéticos: **EC50** (mol comp/mol DPPH) **tEC50** y **AE**(eficacia antirradicálica) $=1/EC50 * tEC50$
- **>AE** \rightarrow El antioxidante ejerce su acción a **MENOR** concentración y en **MENOR** tiempo.

INTERÉS EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

-TEAC(Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

- Radical catiónico ABTS. Mecanismo **SET**
- En presencia de antioxidante \rightarrow **Descenso** de la absorbancia del radical a 658 nm.

Comparación del antioxidante (COMPUESTO FENÓLICO) con el descenso de Trolox.

¡IMPORTANTE! Mecanismo para generar el radical .Ej: formación de metabolitos reactivos(floroglucinol)

-ORAC(Oxygen Radical Absorbance Capacity)

- Radical iniciador (AAPH) \rightarrow Formación radical peróxido más estable ROO
- Mide la capacidad del antioxidante de proteger de la disminución de fluorescencia de una **PROTEÍNA** (fluoresceína) tras oxidación por **RADICALES PERÓXIDOS**.

UNIDAD DE MEDIDA DE TEAC Y ORAC:

Trolox(μ mol Trolox/g o μ mol Trolox/L), un análogo hidrosoluble del alfa-tocoferol.

¡IMPORTANTE: Standard interno y curva de calibrado

Oxidación de grasas

-**Oxidación de LDLs**. Inducción de autooxidación con un iniciador azo o Cu (II) del ácido linoléico o LDL.

Formación de peróxidos de dienos conjugados (máxima abs a esa λ)

-Medida de la absorbancia UV a 234 nm.

- **Disminución de la velocidad de oxidación** en presencia de los polifenoles. Curva de velocidad **inversamente proporcional** a la concentración de polifenoles(antioxidante).

PRODUCTO SECUNDARIO DE OXIDACIÓN LIPÍDICA

-TBARS

- Complejo cromógeno (ác. tiobarbitúrico y malondialdehído **MDA**)
- **+EFECTO ANTIOXIDANTE** \rightarrow menor cantidad de **MDA** generado \rightarrow menor absorbancia medida a $\lambda=532-35$ nm.

Medidas indirectas.

-Ensayo de Folin-Ciocalteu

- Cuantificación de **polifenoles totales** mediante medida de la absorbancia UV a $\lambda=760$ nm.
- Reacción de **REDUCCIÓN** \rightarrow Mayor cambio de coloración (cambio de estado de oxidación) \rightarrow mayor contenido de polifenoles totales.



UNIDAD DE MEDIDA: EQUIVALENTES DE ÁCIDO GÁLICO

4.2 Identificación y separación de polifenoles.

- **Cromatografía líquida(HPLC, UHPLC) y de gases(GC).** Posibilidad de acoplarse a espectrometría de masas(MS).

HPLC: Separación en función de polaridad de compuestos

GC: polaridad y volatilidad. Tratamiento y derivatización previa de muestra.

ÚTIL EN SEPARACIÓN DE ENANTIÓMEROS CON DISTINTA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Actividad antioxidante y polifenoles totales en uva

- **Vinos tintos y blancos** pertenecientes a diversas regiones y variedades presentan una diversidad en su composición polifenólica total \rightarrow mayor en uva tinta que en la blanca, así como en su capacidad antioxidante.
- **Uva y subproductos** con mayor contenido de polifenoles y actividad antioxidante son la **semilla, piel, hojas y tallos** respectivamente.

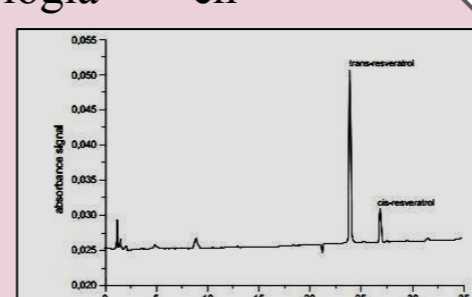
5. CONCLUSIÓN

- **Uvas y vinos** presentan una **gran variedad de compuestos fenólicos** de muy diversas estructuras químicas y pesos moleculares.
- En líneas generales **actividad y cantidad polifenólica mayor uva tinta que blanca.**
- **CORRELACIÓN DE VARIABLES.**

COMPUESTOS EN EXTRACTOS DE PLANTAS

SINERGISMO ENTRE MOLÉCULAS?

- **Beneficios de la uva** \rightarrow Aprovechamiento de los productos tras su procesado \rightarrow atención en las técnicas de **extracción, separación e identificación.** \rightarrow Tecnología en instrumentos analíticos.



- **Nuevos targets de investigaciones científicas futuras.**

- **Aplicaciones terapéuticas.**
- **Productos nutracéuticos, cosméticos y otras industria.**

6. BIBLIOGRAFÍA:

1. Andreu Navarro A. Nuevas metodologías analíticas para la determinación de antioxidantes alimentarios. Tesis doctoral. Córdoba: Universidad de Córdoba, 2011.
2. 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
3. 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.
4. Garrido J., Borges F. Wine and grape polyphenols. A chemical perspective. Food Research International. 2013; 54: 1844-1858. Disponible en: ScienceDirect.
5. 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.
6. 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.
- 7.25. 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.
8. Nur Alam Md., Bristi N.J., Rafiquzzaman Md. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal. 2013; 21(2):143-152.