

DE LA UVA AL VINO: ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y DILUCIDACIÓN DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN DE SUS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias Químicas

Lic. Mariana Soledad Lingua



**Instituto Superior de Investigación, Desarrollo y Servicios en Alimentos
Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos Córdoba
SECyT – CONICET
Universidad Nacional de Córdoba**

2016

Director de Tesis:

Dra. M. Verónica Baroni

Comisión de Tesis:

Dr. Daniel A. Wunderlin

Dra. M. Teresa Baumgartner

Dra. Silvia Kivatinitz

Evaluador Externo:

Dra. Mónica A. Nazareno

A mi Mamá, mi Papá, mis Hermanos y Tomito, por estar siempre...

A Martín, por saber esperar...

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi Directora de Tesis, **Vero**, por su gran compromiso durante estos cinco años de trabajo, por todas sus explicaciones, por ayudarme a organizar las ideas, por enseñarme a “*ver la mitad del vaso lleno en lugar de la mitad vacía*” y que los resultados negativos también son resultados!!!, y por sobre todas las cosas, por ayudarme a tener confianza en mi misma. **ETERNAMENTE AGRADECIDA “V” POR TODA TU CONFIANZA PARA RECORRER JUNTAS ESTE CAMINO CIENTÍFICO!!!**

A **Daniel**, por darme la posibilidad de trabajar en su **excelente grupo de investigación**, no solo por su calidad académica sino también **por su calidad humana**.

A **Val** (Euge) y **Rose** (Ro), dos personas que nunca en mi vida hubiera imaginado iba a encontrar. Me las crucé por primera vez a los pocos meses de iniciado el doctorado en las escaleras del instituto, se acuerdan???. De ahí, nos hicimos inseparables, confidentes, logramos pasar del llanto por tristeza a un llanto de plena felicidad tan solo por escuchar nuestras voces a travez de un teléfono. Gracias Amigas por aparecer en mi vida, por ser mi sostén durante estos cinco años de tesis, sin ustedes el camino se me hubiera hecho más difícil de lo que es. **LAS QUIERO HASTA EL CIELO IDA Y VUELTA, IDA Y VUELTA, IDA Y VUELTA...**

Gracias a toooda la **gente del instituto, el mejor grupo de trabajo!**... Mag, por los riquísimos mates chucareros de las 8:00 am!!! y las risas y charlas compartidas desde primera hora del día. Ju (Jul o Juli) y Jo (Joji, Jojito, Joa) por ponerle todo el espíritu juvenil (quedarías excluído Gastaminza...), alegre y buena onda al instituto!!!. Romi, por estar siempre predispuesta a resolver mis consultas y/o problemas científicos. Sil y Pablo, por las charlas, risas y mates compartidos.

A Nati (Podio), gracias por enseñarme todo, todo, todo (desde la A a la Z con puntos y comas incluídos) en cuanto a la metodología *in vitro* empleada para el estudio de la capacidad antioxidante, y por estar siempre muy bien predispuesta para ayudarme en todo lo que necesitaba. A Nati Pigni, ya que sin su ayuda esta tesis nunca la hubiera podido compilar, ni nunca hubiera tenido una TABLA DE COTENIDO!!! (fue el 23 de diciembre y tenía el cerebro en llamas, te acordás???).

A toooda la gente de Bromato: Vale, Ramón, Martín, Lid, Chana, Andre y Santi (mudado al 1° piso del CIBICI) por la buena predisposición para ceder espacio y/o brindar ayuda para

llevar a cabo determinados experimentos durante la tesis. Además, no puedo dejar de agradecer los mates, las carcajadas y charlas compartidas que hacían del laboratorio un ambiente más que agradable de trabajo.

A toda la gente que colaboró de alguna manera en la realización de esta tesis: Pau, por ayudarme con los muestreos; Carlos Batthyány y su grupo de la UByPA-IPMON, por recibirme en el laboratorio y enseñarme todo sobre los geles 2D; Silvia Moreno y Ric del CEQUIBIEM-UBA, por recibirme en el laboratorio y ayudarme con los análisis MALDI-TOF/TOF de los péptidos; Gera, Martín, Ceci y Mari de CEQUIMAP, por prestarme algunos de los equipos de microbiología; Iara y Mariana de UNESP-Brasil, por colaborar con la realización de los ensayos con células hepáticas.

Finalmente quiero agradecer muy especialmente a **mi Mamá, mi Papá, mis Hermanos, Tomito y a Martín**, que sin entender muy bien lo que hacía todo el día en el laboratorio, supieron valorar mi esfuerzo, mi dedicación y mis logros. Por estar siempre presentes, a pesar del tiempo robado, mis ausencias y/o locuras laborales. Por brindarme a pesar de todo, un amor incondicional. **SON LO MÁS BELLO QUE TENGO EN LA VIDA (junto con Felipe y Nipur, obviamente!!!)**

A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar, pero el mar sería menos si le faltara esa gota...

Madre Teresa de Calcuta

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	i
RESUMEN.....	iii
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Estrés oxidativo y especies reactivas.....	2
1.2 Sistemas naturales de defensa antioxidante.....	4
1.2.1 Antioxidantes naturales endógenos.....	4
1.2.2 Antioxidantes naturales exógenos	5
1.3 Compuestos Polifenólicos	6
1.3.1 Clasificación de los polifenoles	6
1.3.1.1 Compuestos Flavonoideos.....	6
1.3.1.2 Compuestos no Flavonoideos.....	8
1.3.2 Funciones de los polifenoles sobre la salud del hombre	9
1.4 El vino: un alimento rico en compuestos polifenólicos.....	10
1.4.1 La Uva como materia prima del vino	11
1.4.1.1 Desarrollo y morfología de la uva. Acumulación de polifenoles	11
1.4.1.2 Factores que determinan la composición polifenólica de la uva	12
1.4.2 El Vino.....	13
1.4.2.1 Elaboración del vino tinto	13
1.4.2.1.1 El orujo como subproducto de la vinificación.....	14
1.4.2.2 Factores que determinan la composición polifenólica del vino	15
1.5 Justificación del estudio	17
1.6 Objetivos	19
CAPÍTULO 2: CAMBIOS EN EL PERFIL POLIFENÓLICO A LO LARGO DEL PROCESO DE VINIFICACIÓN DE TRES VARIEDADES TINTAS <i>Vitis vinifera</i> L.....	20
2.1 Antecedentes	21
2.2 Materiales y Métodos	23
2.2.1 Estándares y Reactivos	23

2.2.2 Muestras de estudio	23
2.2.2.1 Metodología empleada para el muestreo.....	23
2.2.3 Preparación de las muestras para sus análisis.....	25
2.2.3.1 Extracción de compuestos polifenólicos de uvas y orujos	25
2.2.4 Determinación de Compuestos Polifenólicos	25
2.2.4.1 Contenido de Polifenoles Totales- Técnica de Folin-Ciocalteu	25
2.2.4.2 Perfil de polifenoles por HPLC-DAD-ESI-QTOF.....	26
2.2.5 Análisis Estadísticos de los datos	28
2.2.5.1 Estadística Descriptiva	28
2.2.5.2 Estadística Inductiva- Análisis de la Varianza (ANOVA).....	29
2.2.5.3 Estadística Multivariada.....	29
2.2.5.3.1 Análisis de Componentes Principales (ACP).....	29
2.3 Descripción de los resultados y discusión.....	30
2.3.1 Contenido de polifenoles totales (PT).....	30
2.3.2 Identificación de compuestos polifenólicos por HPLC-DAD-ESI-QTOF	31
2.3.2.1 Antocianos.....	34
2.3.2.2 Flavonoles	35
2.3.2.3 Flavanoles.....	37
2.3.2.4 Ácidos Hidroxicinámicos (AHC).....	38
2.3.2.5 Ácidos Hidroxibenzoicos (AHB).....	38
2.3.2.6 Estilbenos	39
2.3.3 Cambios en el perfil de polifenoles a lo largo de la vinificación.....	39
2.3.3.1 Antocianos.....	44
2.3.3.2 Flavonoles	46
2.3.3.3 Flavanoles.....	47
2.3.3.4 Ácidos Hidroxicinámicos (AHC).....	48
2.3.3.5 Ácidos Hidroxibenzoicos (AHB).....	48
2.3.3.6 Estilbenos	49
2.3.4 Caracterización de las variedades en estudio de acuerdo al perfil de polifenoles	49

2.4 Conclusiones parciales	53
----------------------------------	----

CAPÍTULO 3: EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* A LO LARGO DE LA VINIFICACIÓN DE TRES VARIEDADES TINTAS

<i>Vitis vinifera</i> L.	54
3.1 Antecedentes	55
3.2 Materiales y Métodos	57
3.2.1 Estándares y Reactivos	57
3.2.2 Muestras de estudio	57
3.2.3 Determinación de la Capacidad Antioxidante <i>in vitro</i>	57
3.2.3.1 Ensayo FRAP	57
3.2.3.2 Ensayo ABTS	59
3.2.3.3 Ensayo DPPH.....	60
3.2.4 Análisis Estadísticos de los datos	61
3.2.4.1 Estadística Descriptiva	61
3.2.4.2 Estadística Inductiva- Análisis de la Varianza (ANOVA).....	62
3.2.4.3 Estadística Multivariada.....	62
3.2.4.3.1 Análisis de correlación simple de Pearson (ACSP)	62
3.2.4.3.2 Análisis de Correlación Canónica (ACC)	62
3.2.4.3.3 Análisis de Regresión Múltiple paso a paso (ARM <i>stepwise</i>)	63
3.3 Descripción de los resultados y discusión.....	64
3.3.1 Capacidad Antioxidante.....	64
3.3.2 Correlación entre Capacidad Antioxidante y contenido de compuestos polifenólicos.....	66
3.4 Conclusiones Parciales	74

CAPÍTULO 4: EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *IN VIVO* DE LA UVA, EL ORUJO Y EL VINO DE TRES VARIEDADES TINTAS *Vitis vinifera* L... ..

4.1 Antecedentes	76
4.2 Materiales y Métodos	79
4.2.1 Estándares y Reactivos	79
4.2.2 Muestras de estudio	79

4.2.3 Determinación de la Capacidad Antioxidante <i>in vivo</i>	79
4.2.3.1 Ensayo de sobrevida.....	80
4.2.3.2 Determinación de la oxidación intracelular.....	81
4.2.3.3 Medición de la actividad de enzimas antioxidantes	82
4.2.3.4 Estudios proteómicos por 2D-PAGE y MALDI-TOF/TOF	82
4.2.4 Determinación de la Capacidad Antioxidante en células HepG2	85
4.2.4.1 Ensayo del MTT.....	85
4.2.5 Análisis Estadísticos de los datos	87
4.2.5.1 Estadística Descriptiva	87
4.2.5.2 Estadística Inductiva- Análisis de la Varianza (ANOVA)	87
4.2.5.3 Estadística Multivariada	87
4.2.5.3.1 Análisis de Correlación Canónica (ACC)	87
4.2.5.3.2 Análisis de Regresión Múltiple paso a paso (ARM <i>stepwise</i>)	87
4.3 Descripción de los resultados y discusión.....	88
4.3.1 Capacidad Antioxidante <i>in vivo</i>	88
4.3.1.1 Sobrevida.....	88
4.3.1.2 Oxidación Intracelular.....	93
4.3.1.3 Actividad de Enzimas Antioxidantes	95
4.3.2 Influencia de los compuestos polifenólicos en la Capacidad Antioxidante <i>in vivo</i>	98
4.3.3 Expresión del Proteoma Celular	103
4.3.3.1 Cambios en el proteoma celular inducidos por H ₂ O ₂	107
4.3.3.2 Cambios en el proteoma celular inducidos por el vino tinto	109
4.3.4 Evaluación de la capacidad antioxidante en células HepG2.....	112
4.4 Conclusiones Parciales.....	114
CAPÍTULO 5: BIODISPONIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS ANTIOXIDANTES	
DE LA UVA Y EL VINO TINTO LUEGO DE UN PROCESO DE DIGESTIÓN	
GASTRO-INTESTINAL SIMULADO	115
5.1 Antecedentes	116
5.2 Materiales y Métodos	119
5.2.1 Estándares y Reactivos	119

5.2.2 Muestras de estudio	119
5.2.3 Ensayo de digestión gastro-intestinal <i>in vitro</i>	119
5.2.3.1 Determinación de Compuestos Polifenólicos.....	120
5.2.3.2 Determinación de la Capacidad Antioxidante <i>in vitro</i>	121
5.2.4 Análisis Estadísticos de los datos	121
5.2.4.1 Estadística Descriptiva	121
5.2.4.2. Estadística Inductiva- Análisis de la Varianza (ANOVA)	121
5.3 Descripción de los resultados y discusión.....	122
5.3.1 Bioaccesibilidad y Biodisponibilidad de polifenoles a lo largo de la digestión gastro-intestinal	122
5.4 Conclusiones Parciales.....	135
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES FINALES.....	136
BIBLIOGRAFÍA.....	140
PUBLICACIONES ORIGINADAS EN ESTA TESIS	159

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-etilenbenzotiazolin-6-sulfónico).

ac: acetyl.

ACC: Análisis de Correlación Canónica.

ACP: Análisis de Componentes Principales.

ARM: Análisis de Regresión Múltiple.

AHB: Ácido Hidroxibenzoico.

AHC: Ácidos Hidroxicinámicos.

caf: cafeoil.

CA: Capacidad Antioxidante.

CAT: Catalasa.

Ci: Cianidina.

cm: cumaroil.

CS: Cabernet Sauvignon.

2D: Bidimensional.

DAD: Detector con arreglo de diodos.

Dp: Delfinidina.

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.

EROs: Especies reactivas de oxígeno.

ERNs: Especies reactivas de nitrógeno.

ERSs: Especies reactivas de azufre.

ESI: Ionización por electropulverización ("*Electrospray Ionization*").

ET: Equivalente al trolox.

EAG: Equivalente al ácido gálico.

FRAP: Poder antioxidante de reducción del ión férrico.

glc: glucósido.

glcr: glucurónido.

GPx: Glutación peroxidasa.

G-6-PDH: Glucosa-6-fosfato dehidrogenasa.

GR: Glutación reductasa.

GSH: Glutación reducido.

GSSG: Glutación oxidado.

HAT: transferencia de un átomo de hidrógeno ("*Hydrogen Atom Transference*").

HO[•]: Radical hidroxilo.

- HO₂[•]**: Radical hidroperoxilo.
- H₂O₂**: Peróxido de hidrogeno.
- HPLC**: Cromatografía líquida de alta eficacia (“*High Performance Liquid Chromatography*”).
- Isorh**: Isorhamnetina.
- Kp**: Kaempferol.
- Lar**: Laricitrina.
- LD**: Límite de detección.
- LC**: Límite de cuantificación.
- Mer**: Merlot.
- Mir**: Miricetina.
- MS**: Espectrometría de masas (“*Mass spectrometry*”).
- MS/MS**: Espectrometría de masas/ masas en tándem (MS²).
- Mv**: Malvidina.
- m/z**: Relación masa/ carga.
- NADP⁺**: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado.
- NADPH**: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido.
- NCBI**: Centro Nacional para la Información Biotecnológica (“*National Center for Biotechnology Information*”).
- ppm**: Partes por millón.
- Pn**: Peonidina.
- PPP**: Vía de las pentosa fosfato.
- PT**: Polifenoles totales.
- Pt**: Petunidina.
- QTOF**: Analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo (“*Quadrupole-Time-of-Flight*”).
- Quer**: Quercetina.
- SET**: transferencia de un electrón (“*Single Electron Transfer*”).
- Sir**: Siringetina.
- SO₂**: Dióxido de Azufre.
- SOD**: Superóxido dismutasa.
- Syr**: Syrah.
- t_r**: Tiempo de retención.
- UV**: Ultravioleta.
- VIS**: Visible.

RESUMEN

El objetivo general de esta tesis fue evaluar los cambios en las características antioxidantes, es decir perfil polifenólico y capacidad antioxidante, a lo largo del proceso de vinificación de variedades de uvas *Vitis vinifera* L. tintas producidas en Argentina. Las variedades estudiadas fueron Syrah, Merlot y Cabernet Sauvignon. Las muestras analizadas fueron la uva, como materia prima del proceso, el orujo y la fermentación alcohólica, como intermediarios generados, y el vino, como producto elaborado final. 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 *in vivo* (sobrevida, oxidación intracelular, actividad de GPx y GR, y estudios proteómicos) empleando a *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico.

Los resultados obtenidos del estudio del contenido de polifenoles totales (PT) demostraron que ninguna variedad se caracterizó por el mayor contenido de PT en todas las muestras estudiadas a lo largo de la vinificación, sino que éste fue dependiente de la etapa del proceso analizado. El perfil de polifenoles fue característico de cada variedad, sufriendo importantes cambios cuali y cuantitativos durante la vinificación. La variedad Syrah se caracterizó por el mayor contenido en compuestos antocianos; Merlot se destacó por su mayor contenido en *trans*-resveratrol; mientras que el perfil característico de Cabernet Sauvignon fue determinado por la etapa del proceso de vinificación analizada.

El estudio de la CA *in vitro* e *in vivo* mostró diferencias entre variedades y muestras a lo largo de la vinificación. La utilización del análisis de correlación canónica (ACC) y análisis de regresión múltiple (ARM) permitieron explicar dichas diferencias, poniendo en evidencia la alta influencia del tipo y contenido (perfil cuali y cuantitativo) de compuesto polifenólico sobre la bioactividad de las muestras. Específicamente, el ARM permitió demostrar que esta propiedad sería el resultado de la combinación de efectos antioxidantes y pro-oxidantes que los compuestos polifenólicos ejercen sobre las mismas.

La variedad Syrah fue la que presentó la mayor CA *in vivo*, como consecuencia de su perfil polifenólico caracterizado por el mayor contenido en compuestos antocianos. Además, se observó que el mayor contenido de *trans*-resveratrol en la uva y el vino Merlot contribuyó a su menor CA. Entre las muestras estudiadas, la uva (materia prima del proceso) presentó la mayor bioactividad como consecuencia de su perfil polifenólico diferencial (con mayor

contenido de kaempferol-3-O-glucósido y ácido fértrico) en comparación al vino y el orujo (con mayor contenido de etil galato).

Uno de los mecanismos por los cuales los polifenoles ejercerían su acción biológica es el incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes GPx (glutación peroxidasa) y GR (glutación reductasa) con una consecuente disminución en la oxidación intracelular. Asimismo, a través de estudios proteómicos, se observó que los polifenoles del vino modifican la expresión de ciertas proteínas de *S. cerevisiae*. En este sentido, los resultados obtenidos sugieren que la actividad biológica observada sería consecuencia del efecto hormético de los polifenoles sobre la célula, lo que implicaría que los polifenoles actuarían como leves agentes pro-oxidantes, induciendo en la célula una respuesta adaptativa, probablemente activando la síntesis de proteínas en respuesta a estrés e induciendo la actividad de enzimas antioxidantes, que la prepara para hacerle frente a situaciones de estrés más severas.

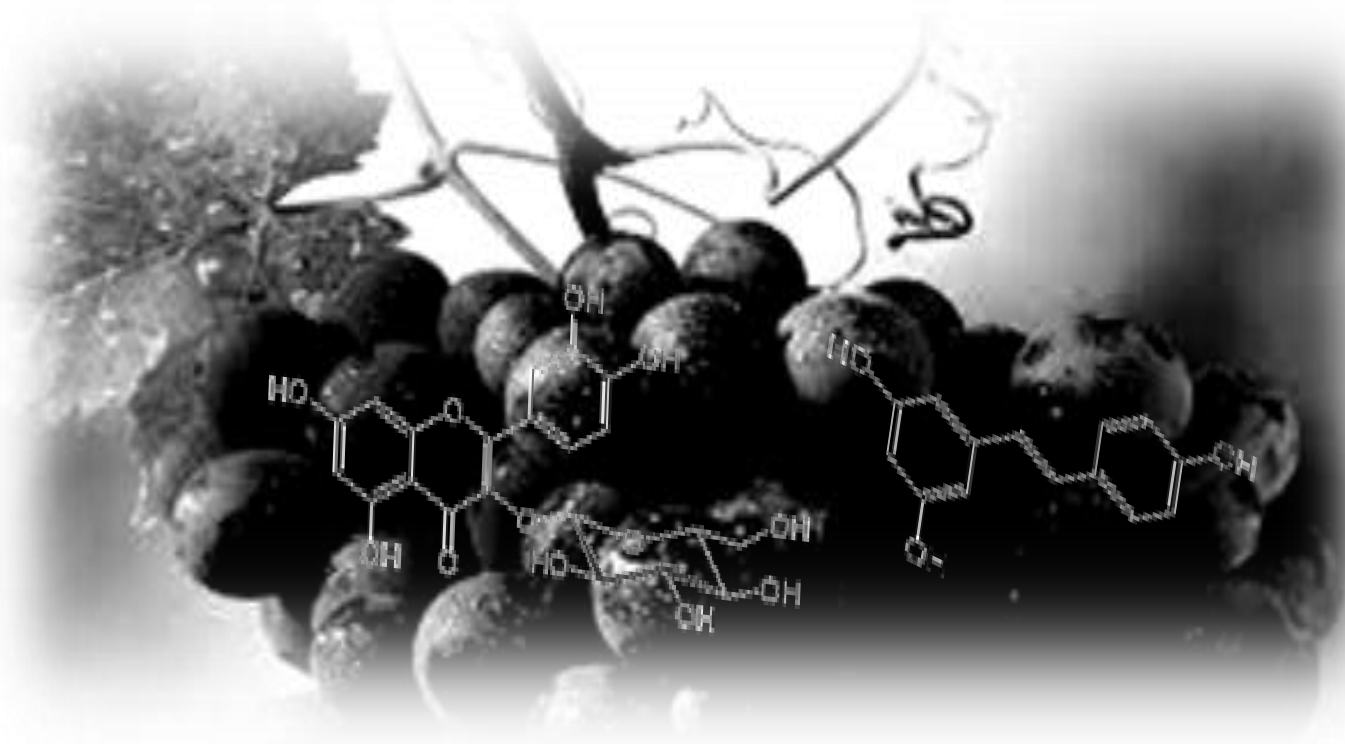
Finalmente, se estudió la estabilidad y bioaccesibilidad de los polifenoles de la uva y el vino, utilizando un modelo que simula la digestión gastro-intestinal humana y posterior absorción a través del epitelio intestinal. Los resultados mostraron que la digestión de la uva en la boca y el estómago incrementan lo bioaccesibilidad de sus PT, mientras que en el vino (matriz alimenticia líquida) estos compuestos ya se encuentran todos bioaccesibles. 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 colon viable (aquellos que quedarían retenidos en el intestino grueso). Los antocianos fueron encontrados entre los compuestos con mayor porcentaje de recuperación en ambas fracciones tanto para uva como para vino.

El análisis conjunto de los resultados obtenidos permite concluir que la CA de la uva tinta *Vitis vinifera* L. y los productos derivados del proceso de vinificación, el vino y el orujo, sería función del perfil cuali-cuantitativo de polifenoles de la muestra. La variedad Syrah fue la que presentó la mayor CA *in vivo* y los antocianos fueron, dentro de las distintas familias de polifenoles, los más importantes para la CA *in vitro* e *in vivo* observada. La actividad biológica observada sería consecuencia del efecto hormético de los polifenoles sobre la célula. Se evidenció que el verdadero rol biológico de los polifenoles no solo dependería de sus estructuras químicas, sino que además estaría ampliamente influenciado por el entorno en el

que se encuentran: es decir, el tipo de alimento, el procesamiento del mismo, la interacción con componentes celulares, y la estabilidad y bioaccesibilidad bajo las condiciones del tracto digestivo.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL



1.1 Estrés oxidativo y especies reactivas

En los últimos años numerosos estudios sugieren que muchas de las enfermedades crónicas padecidas por la sociedad, entre las que se mencionan las neurodegenerativas, cardiovasculares, diferentes tipos de cánceres, 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 químico 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 ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroperoxilo (HO_2^{\bullet}), radical hidroxilo (HO^{\bullet}), óxido nítrico (NO), y otras especies como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (1O_2) y ácido hipocloroso (HOCl). Por otro lado, las ERNs derivan de la reacción entre NO y $O_2^{\bullet-}$ para formar peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$), mientras que las ERSs son fácilmente formadas por la reacción de EROs con tioles (Carocho & Ferreira, 2013).

Muchas EROs son continuamente producidas en el organismo como consecuencia del metabolismo normal de las células, a partir del oxígeno molecular utilizado (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). Debido a que más del 90 % del O_2 consumido es usado para producir energía en la mitocondria, se estima que dicha organela, mediante la fosforilación oxidativa en la cadena respiratoria, constituye la principal fuente sub-celular de EROs. Además, menores cantidades de dichas especies son también generadas en los peroxisomas, organelas involucradas en el metabolismo de lípidos, por los leucocitos, que intervienen en la fagocitosis durante procesos inflamatorios, y por la actividad de oxidasas (lipo-oxigenasas, ciclo-oxigenasas, xantina oxidasa y NADPH oxidasa) que catalizan la auto-oxidación de diferentes moléculas (Lushchak, 2011). 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 (**Figura 1.1**) (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). Bajo estas condiciones, dichas especies producen reacciones en cadena, capaces de dañar o destruir la función de las biomoléculas. Así, por ejemplo, la oxidación de proteínas conduce a la formación de grupos carbonilos en sus estructuras, haciéndolas más susceptibles a la degradación proteolítica. En el caso del ADN (ácido desoxirribonucleico), la reacción con especies reactivas (EROs y otras) conduce a mutaciones, ya sea por eliminaciones, inserciones y/o reorganizaciones en pares de bases. También, la oxidación de lípidos inducida por especies reactivas causa alteraciones en las funciones de las membranas celulares, modificando su permeabilidad y desestabilizándolas. Finalmente, este daño sobre la integridad y funcionalidad de las biomoléculas culmina impactando en una variedad de procesos bioquímicos y fisiológicos que pueden llevar incluso a la muerte celular (Carocho & Ferreira, 2013; Gaté *et al.*, 1999). 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).

produciendo durante el metabolismo celular. Este sistema de defensa antioxidante endógeno se clasifica de acuerdo a su naturaleza en antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

Los *antioxidantes enzimáticos*, se dividen en defensa enzimática primaria y secundaria. La defensa primaria está integrada por tres enzimas que previenen la formación de radicales libres o los neutraliza: superóxido dismutasa (SOD), que convierte el anión radical superóxido en peróxido de hidrógeno, y catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), que convierten el peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno. La GPx también cataliza la reducción de peróxidos orgánicos a expensas del GSH como donante de electrones (Carocho & Ferreira, 2013; Gaté *et al.*, 1999). En cuanto a la defensa secundaria, aunque no neutralizan radicales libres directamente, su rol es fundamental para el correcto funcionamiento del sistema antioxidante endógeno. Esta defensa incluye a las enzimas glutatión reductasa (GR) y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G-6-PDH). Ambas permiten mantener el balance intracelular de glutatión reducido y oxidado (GSH: GSSG). Para ello, GR reduce el glutatión oxidado a expensas de la oxidación de NADPH, mientras que G-6-PDH se encarga de regenerar el NADPH (**Figura 1.1**) (Carocho & Ferreira, 2013; Gaté *et al.*, 1999). Los sistemas tiorredoxina y glutarredoxina catalizan la reducción de puentes disulfuro de proteínas oxidadas pero con diferentes afinidades por los sustratos, de forma que ambos se complementan en la reparación de grupos tiol (-SH) (Yoshitake *et al.*, 1994).

En cuanto a los *antioxidantes no enzimáticos*, están conformados por compuestos de bajo peso molecular que interactúan con los antioxidantes enzimáticos. Incluyen a la vitamina A, coenzima Q10, ácido úrico y glutatión (Carocho & Ferreira, 2013). Entre éstos, el más importante es el glutatión (GSH), un tripéptido formado por los aminoácidos ácido glutámico, glicina y cisteína, que representa el antioxidante no enzimático con un grupo tiol (-SH) más abundante en los organismos vivos y, predominantemente, en células eucariotas. Tiene funciones indispensables en los mecanismos de defensa antioxidante, convirtiendo el peróxido de hidrógeno a agua, interviniendo en la reducción de peróxidos orgánicos y en la prevención de la oxidación de proteínas (**Figura 1.1**) (Gaté *et al.*, 1999; Limón-Pacheco & Gonsebatt, 2009).

1.2.2 Antioxidantes naturales exógenos

En situaciones de estrés oxidativo muchas veces el sistema de defensa antioxidante endógeno no es suficiente para contrarrestar el efecto de los radicales libres, por lo que es necesario reforzarlo con antioxidantes exógenos para mantener las concentraciones de las

especies reactivas en niveles bajos y, de esta manera, conservar la homeostasis del organismo (Pietta, 2000). Este sistema de defensa está constituido por los antioxidantes naturales que el hombre incorpora por medio de los alimentos que ingiere. Las principales fuentes de estos antioxidantes naturales exógenos son las frutas, las verduras, los cereales y los alimentos derivados de su procesamiento, debido al alto contenido en **compuestos polifenólicos** (Rice-Evans, 2001; Scalbert *et al.*, 2005).

1.3 Compuestos Polifenólicos

Los compuestos polifenólicos son un grupo muy heterogéneo de fitoquímicos que derivan del metabolismo secundario de las plantas a través de la vía del ácido shiquímico, a partir de aminoácidos aromáticos como fenilalanina, tirosina y triptófano. Su síntesis ha sido implicada en funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. 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. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas actuando como pesticidas naturales (Ávalos García & Pérez-Urria Carril, 2009).

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).

1.3.1 Clasificación de los polifenoles

Más de 8000 compuestos polifenólicos han sido descritos en literatura, todos ampliamente distribuidos en el reino vegetal y, por lo tanto, en los alimentos derivados del mismo. Dichos compuestos se clasifican en función del número y el arreglo de sus átomos de carbono. En este sentido, se pueden distinguir los compuestos **flavonoideos** y **no flavonoideos** (Liu, 2004).

1.3.1.1 Compuestos Flavonoideos

Los flavonoides constituyen el grupo más importante y abundante de compuestos polifenólicos en la naturaleza, de los cuales se han descrito más de 4000 derivados. Todos comparten una estructura química común, el 2-fenil-benzopirano, conformada por un

esqueleto C₆-C₃-C₆, la cual consiste en 2 anillos aromáticos (A y B) unidos por 3 átomos de carbono que forman un heterocíclico oxigenado (anillo C) (**Figura 1.2**). Las diferencias en la estructura genérica del heterocíclico C los clasifica como **antocianidinas**, **flavonoles**, **flavonoles**, **flavonas**, **isoflavonas** y **flavanonas**. (Liu, 2004). A su vez, las diferencias en el patrón de sustitución (hidroxilación, alquilación, glicosilación, acilación y sulfonación) en los anillos A y B dan lugar a los distintos compuestos que integran cada una de estas clases de flavonoides (**Figura 1.2**) (Fantini *et al.*, 2015).

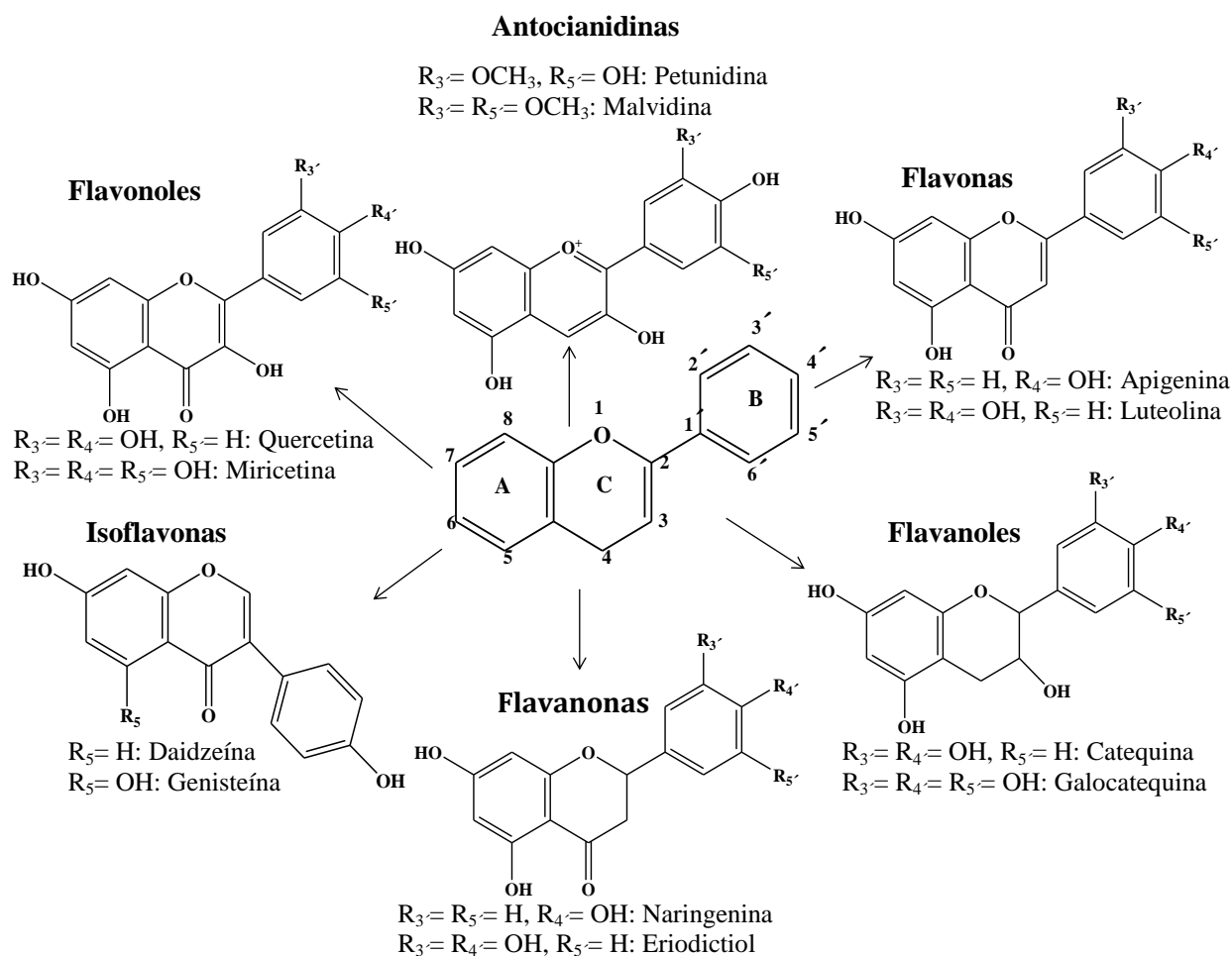


Figura 1.2. Estructura química de flavonoides. Adaptado de Manach *et al.*, (2004).

Los flavonoides en la naturaleza se encuentran principalmente en sus formas glicosiladas o esterificadas con ácidos orgánicos o ácidos hidroxicinámicos, pero también pueden encontrarse como agliconas especialmente debido a la hidrólisis que sufren sus precursores durante el procesamiento de los alimentos (Liu, 2004).

1.3.1.2 Compuestos no Flavonoideos

La familia de los compuestos no flavonoideos está principalmente integrada por los ácidos fenólicos y los estilbenos (Martínez-Navarrete *et al.*, 2008).

Los **ácidos fenólicos** son compuestos derivados del ácido cinámico y ácido benzoico. Se clasifican de acuerdo a éstos en ácidos hidroxicinámicos (AHC) y ácidos hidroxibenzoicos (AHB), y el esqueleto básico de cada uno de ellos es C₆-C₃ y C₆-C₁, respectivamente (Liu, 2004). Las diferencias en el patrón de sustitución sobre el anillo aromático crea la variedad de compuestos que integran a cada una de estas dos clases de ácidos fenólicos (**Figura 1.3**). Los AHC son más abundantes que los AHB, y en la naturaleza se los encuentra principalmente como derivados glicosilados o esterificados con ácido quínico, shiquímico y tartárico (Manach *et al.*, 2004).

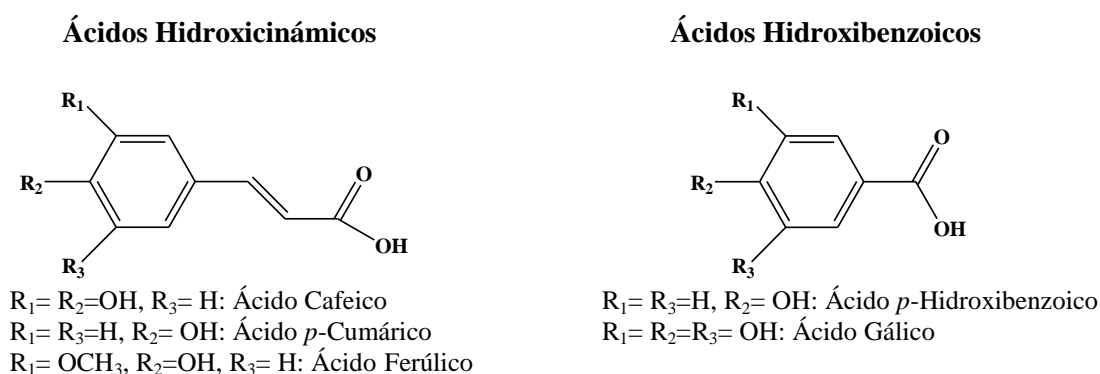


Figura 1.3. Estructura química de ácidos fenólicos. Adaptado de Liu (2004).

En cuanto a los **estilbenos**, son compuestos derivados del 3,5,4'-trihidroxiestilbeno o resveratrol, cuya estructura química presenta un esqueleto C₆-C₂-C₆, la cual consiste en 2 anillos aromáticos unidos por un puente eteno. En la naturaleza se encuentra principalmente el isómero de configuración *trans* y su derivado glicosilado, *trans*-resveratrol-3-O-glucósido, conocido con el nombre de *trans*-piceido (**Figura 1.4**) (Vergara *et al.*, 2012).

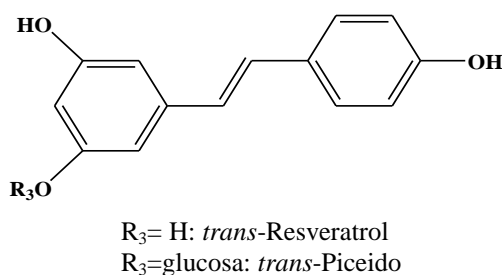


Figura 1.4. Estructura química de estilbenos. Adaptado de Manach *et al.* (2004).

1.3.2 Funciones de los polifenoles sobre la salud del hombre

Debido a su origen vegetal los compuestos polifenólicos forman parte de la dieta normal del hombre ya que los incorpora a través de sus principales fuentes dietarias: las frutas, verduras, cereales y los productos derivados de su procesamiento. Estas sustancias no tienen una función nutricional clásicamente definida, tampoco se los considera esenciales para la salud del hombre, sin embargo, pueden tener un impacto significativo en el curso de determinadas enfermedades y ser indispensables a largo plazo para la salud (Martínez-Valverde et al., 2000).

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 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 los polifenoles 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, activando las enzimas antioxidantes y/o modulando la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en la protección celular (Procházková *et al.*, 2011). Es importante tener en cuenta que la eficiencia de los polifenoles como antioxidantes va a depender también de las interacciones que puedan ocurrir con otros antioxidantes, la accesibilidad y concentración al sitio de acción (asociado a su lipofilicidad o hidrofiliicidad) y el metabolismo que puedan sufrir hasta llegar a dicho sitio (Niki, 2010).

1.4 El vino: un alimento rico en compuestos polifenólicos

Históricamente el consumo de vino ha sido relacionado con la promoción de la salud y prevención de enfermedades, y a partir de la postulación de la “Paradoja Francesa” se ha dado un marco científico a dicha relación.

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). En el año 2004, la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) lo incluye como uno de los alimentos opcionales de la pirámide nutricional, por los numerosos estudios que avalan que su consumo moderado puede tener efectos beneficiosos para la salud.

En 1991, un estudio realizado por Renaud & De Lorgeril (1992) utiliza el término “Paradoja Francesa” para describir la relación entre el elevado consumo de grasas saturadas (de origen animal) en la dieta francesa y la baja incidencia de enfermedades coronarias. Dicha paradoja surge de los resultados obtenidos de estudios epidemiológicos coordinados por la Organización Mundial de la Salud en el marco del proyecto MONICA (Proposal for Multinational **M**onitoring of Trends and Determinants in **C**ardiovascular Disease), cuyo objetivo era monitorear a lo largo de 10 años la incidencia de mortalidad y morbilidad en la población mundial por enfermedades cardiovasculares, y así poder determinar sus causas (Tunstall-Pedro *et al.*, 1988). Los resultados mostraban que en la mayoría de los países, el alto consumo de grasas saturadas estaba positivamente asociado con una alta mortalidad por enfermedades coronarias. Sin embargo, la situación en Francia era paradójica: tenían un alto consumo de grasas saturadas, pero baja mortalidad por enfermedades coronarias, y Renaud & De Lorgeril atribuyeron este paradójico resultado al alto consumo de vino que tenía el país (200- 300 mL/ día). Desde entonces, una gran cantidad de estudios fueron realizados con el objetivo de dilucidar la relación entre el vino y las enfermedades del corazón.

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).

1.4.1 La Uva como materia prima del vino

La uva constituye la materia prima de vital importancia para la elaboración del vino.



Figura 1.5. *Vitis vinifera* L.

Es el fruto obtenido de la vid, planta semileñosa y trepadora perteneciente a la familia biológica conocida como *vitaceae*. Esta familia posee once géneros diferentes, pero sólo el *Vitis* es interesante como fruta vitivinícola. Dentro de este género existen alrededor de 60 especies, de las cuales *Vitis vinifera* L., de origen europeo, es una de las especies de vid que proporciona uvas aptas para la vinificación (This *et al.*, 2006) (**Figura 1.5**).

Entre las variedades tintas de alta calidad enológica que demuestran un continuo incremento en la superficie cultivada en Argentina se encuentran Syrah, Merlot y Cabernet Sauvignon. Dichas cepas representaron el 33,3% del total de uvas tintas de alta calidad enológica cultivadas en el año 2014 en el país (INV, 2015).

1.4.1.1 Desarrollo y morfología de la uva. Acumulación de polifenoles

La uva es una baya que la vid produce organizada en racimos de maduración



Figura 1.6. Racimo de uvas.

heterogénea, donde el raspón constituye la estructura leñosa y ramificada de soporte para los granos (**Figura 1.6**). Su desarrollo presenta dos períodos de crecimiento sigmoide 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 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).

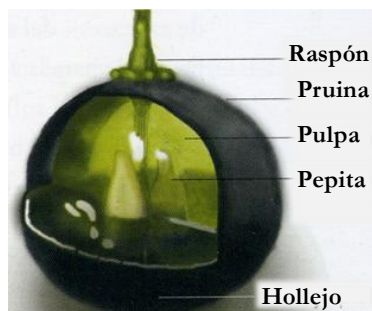


Figura 1.7. Partes de la uva.

En cada baya se pueden distinguir tres partes, cuya composición interesa conocer para luego explicar la del vino: las pepitas o semillas, la pulpa, y el hollejo o piel (**Figura 1.7**). La pulpa aporta al vino componentes mayoritarios como el agua, azúcares (glucosa y fructosa), ácidos orgánicos (málico y tartárico), y compuestos fenólicos del tipo ácidos hidroxicinámicos. El hollejo aporta compuestos polifenólicos como antocianos, flavonoles, flavanoles, estilbenos y ácidos hidroxicinámicos, además de compuestos aromáticos, mientras que las semillas contribuyen fundamentalmente con flavanoles y ácidos hidroxibenzoicos (Conde *et al.*, 2007).

En comparación a las variedades de mesa, las uvas para vinificar son pequeñas, muestran de 7 a 15 mm de diámetro, y pesan entre 1 y 2 g. Presentan una piel gruesa, una pulpa jugosa, y se caracterizan por un alto contenido de azúcares simples (mayor al 19 % en peso fresco). Además, su hollejo está recubierto por una fina capa de sustancia cerosa llamada pruina, a la que se debe el brillo aperlado de los granos y el carácter hidrofóbico de la piel. Dicha sustancia se encarga de fijar las levaduras, bacterias, mohos y otros microorganismos del ambiente que luego fermentarán el mosto (**Figura 1.7**) (Conde *et al.*, 2007).

1.4.1.2 Factores que determinan la composición polifenólica de la uva

La composición polifenólica final de la uva depende de varios factores que influyen a lo largo de su proceso de desarrollo y maduración: el genotipo, el ambiente y las condiciones de cultivo. 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. Así, por ejemplo, la temperatura elevada tiene un efecto negativo sobre la acumulación de antocianos en la piel de las uvas tintas (Downey *et al.*, 2006); además, 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.

1.4.2 El Vino

El vino es una bebida elaborada a partir de la uva fresca mediante fermentación alcohólica de su jugo o mosto. Su graduación alcohólica no puede ser inferior al 8,5% (OIV, 2015).

1.4.2.1 Elaboración del vino tinto

En términos generales, la elaboración de un vino tinto varietal consta de las siguientes etapas (Blouin & Peynaud, 2004):

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, donde se hace una primera selección separando los racimos dañados. Seguidamente son transportados cuidadosamente para evitar que los granos se deterioren.

Despalillado. En esta etapa se elimina el raspón, ya que la presencia de esta estructura vegetal conferiría al vino sabores herbáceos y amargos desagradables, al tiempo que afectaría su contenido ácido y disminuiría su grado alcohólico.

Estrujado. Consiste en la rotura por presión del fruto. Del estrujado surge una pasta viscosa compuesta de jugo procedente de las pulpas de uvas o mosto, hollejos rotos y pepitas.

Corrección de los mostos. A la pasta obtenida del estrujado se le añade anhídrido sulfuroso, ingrediente encargado de seleccionar la fauna microbiana que va a intervenir luego en la fermentación del mosto. También ayudará a la extracción y a una mejor disolución de los pigmentos.

Fermentación alcohólica y maceración. Durante la fermentación alcohólica, las levaduras transforman los azúcares (glucosa y fructosa) en alcohol etílico y anhídrido carbónico. El desprendimiento de este gas provoca el burbujeo y el aroma característico de una cuba de mosto en fermentación. Durante la maceración, el mosto está en contacto con las partes sólidas de la uva (hollejos y pepitas), permitiendo la extracción de los compuestos polifenólicos.

Remontado. El remontado consiste en extraer con bombas el mosto de la parte inferior del tanque e introducirlo por la parte superior para remojar el sombrero (capa de hollejos) y reactivar la extracción de los pigmentos colorantes.

Descubado. Finalizada la fermentación alcohólica-maceración se realiza el descube, que consiste en separar el mosto fermentado líquido de las partes sólidas de la uva (hollejos y pepitas), denominado orujo. El mosto fermentado se llevará a otro depósito para que sufra una segunda fermentación (maloláctica).

Fermentación maloláctica. Esta segunda fermentación consiste en la transformación por las bacterias lácticas del ácido málico, un ácido fuerte procedente de la uva, en otro más suave y untuoso como el ácido láctico, y anhídrido carbónico.

Clarificación, Estabilización y Filtración. El vino es sometido a diversos trasiegos y tratamientos de clarificación y estabilización, tendientes a eliminar material sólido constituido principalmente por restos de levaduras muertas denominado lías o borras, que se depositan en el fondo de las cubas tras la fermentación del vino. Estos procesos tienden a conservar límpido al producto final.

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. Durante esta fase el vino se enriquece en compuestos aromáticos y se estabiliza su color.

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. El proceso de crianza culmina cuando el enólogo determina que el vino ha alcanzado la calidad deseada.

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 (mencionados como taninos por los enólogos); estos últimos como uno de los componentes que más atributos de calidad proporciona al vino (Casares Faulín, 2010).

1.4.2.1.1 El orujo como subproducto de la vinificación

La industria vitivinícola genera gran cantidad de residuos sólidos orgánicos derivados del proceso de vinificación. Específicamente, son tres los que se generan en la elaboración del vino tinto: raspones, lías y orujos (**Sección 1.4.2.1**), representando este último la mayor proporción (Barcia, 2014).



Figura 1.8. Orujo de uvas tintas.

El orujo es el material vegetal fermentado que se obtiene luego del proceso de descube durante la elaboración del vino tinto (**Figura 1.8**). Está constituido principalmente por los hollejos y pepitas de las uvas (Barcia, 2014).

Si bien durante la etapa de maceración/fermentación muchos de los compuestos químicos de la uva son extraídos y transferidos al vino, grandes cantidades quedan remanentes en el orujo. La composición química de este residuo es bastante compleja. Contiene sustancias que forman parte de la estructura celular del tejido vegetal (lignina, hemicelulosa, celulosa y pectinas), sustancias que originalmente se encontraban en los hollejos y pepitas, y aquellas que se formaron durante el proceso de vinificación como alcoholes, ácidos, sustancias minerales, azúcares y nuevos compuestos polifenólicos (Fontana *et al.*, 2013).

Uno de los principales problemas de la industria vitivinícola es la generación de grandes cantidades de este residuo en muy cortos períodos de tiempo al año. Los tratamientos para reducir el impacto ambiental por la generación de este residuo generan sobrecostos a las explotaciones vitivinícolas. Sin embargo, su reutilización como materia prima para la obtención de otros productos de valor industrial supone una oportunidad de negocio rentable además de realizar un claro beneficio medioambiental. En este sentido, el orujo representa una potencial fuente natural, segura, económica y sustentable de numerosos compuestos polifenólicos antioxidantes (Fontana *et al.*, 2013).

1.4.2.2 Factores que determinan la composición polifenólica del vino

La composición fenólica del vino depende básicamente de dos factores. El primero, y más influyente, corresponde a la variedad de la uva utilizada como materia prima. Esto es debido a que algunos de sus polifenoles constituyentes son transferidos al vino por un simple proceso de partición sólido/líquido, mientras que otros derivan de reacciones químicas y/o enzimáticas que sufren sus precursores a lo largo del proceso de vinificación (Monagas *et al.*, 2003; Monagas *et al.*, 2005; Somers *et al.*, 1986). El segundo factor lo constituye el tipo de práctica enológica empleada y tiene efectos cuantitativos sobre la composición final del vino. Ésta consiste en modificar alguna de las variables (tiempo, temperatura, cepa de levadura, adición de enzimas, dosis de SO₂) durante el proceso de vinificación tendiente a aumentar el

contenido de polifenoles, pero preservando las características naturales del producto y sin producir un cambio inaceptable (Atanacković *et al.*, 2012; Benito *et al.*, 2011).

Los resultados de los estudios epidemiológicos y la Paradoja Francesa, la hipótesis de los antioxidantes naturales, el creciente mercado nacional e internacional del vino y el auge de los alimentos funcionales en respuesta a la demanda de los consumidores interesados en alimentos seguros y beneficiosos para su salud, impulsan día a día la investigación sobre la actividad biológica de los compuestos polifenólicos de la uva, el orujo y el vino tinto (Rodrigo *et al.*, 2011).

1.5 Justificación 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 tinta *Vitis vinifera* L. y sus derivados del proceso de vinificación: el vino y el orujo. Estos tres 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 (**Figura 1.9**), 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).

Específicamente, la provincia de San Juan cuenta con 47.926 hectáreas de superficie implantada con vid, donde el 71,2 % es destinado para vinificación. Durante el año 2014 la elaboración de vinos en esta provincia representó el 18 % de la producción nacional siendo, luego de Mendoza, la principal provincia productora de vino en el país (INV, 2015).

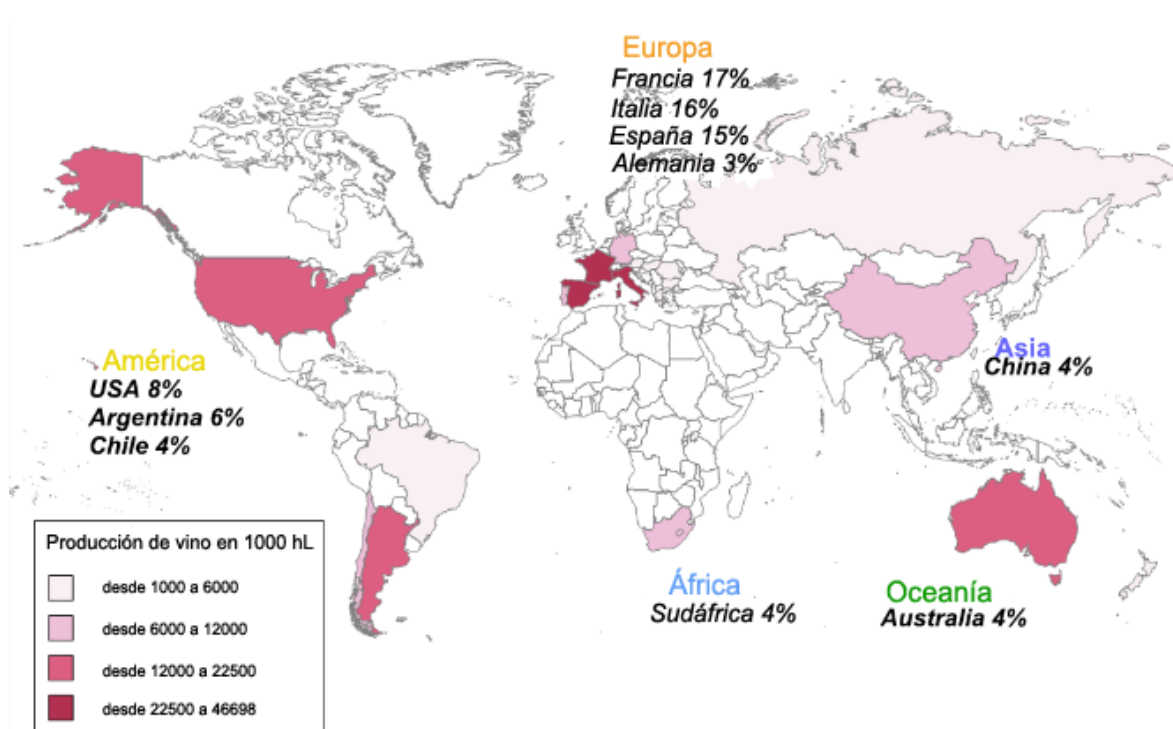


Figura 1.9. Principales países productores mundiales de vino en 2014. Fuente: OIV (2015).

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 cuali y cuantitativamente la composición fenólica de la uva, el orujo 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. Adicionalmente, es muy escaso el conocimiento 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. Además, el estudio de las características antioxidantes del orujo, presupone un interesante punto de partida para su re-utilización por la industria de los alimentos como una fuente inocua, sustentable y natural de compuestos bioactivos.

1.6 Objetivos

El presente trabajo de tesis doctoral propone evaluar las características antioxidantes, es decir perfil polifenólico y capacidad antioxidante, a lo largo del proceso de vinificación de variedades de uvas *Vitis vinifera* L. tintas producidas en Argentina.

El estudio de la asociación entre ambos parámetros sumado al entendimiento de los mecanismos de acción por los cuales los polifenoles ejercerían su potencial actividad antioxidante, presupone un aporte científico novedoso como una manera de predecir posibles respuestas en humanos que consuman estos antioxidantes naturales. Adicionalmente, se espera que los resultados de esta tesis permitan el desarrollo de nuevas prácticas de cultivo y enológicas, destinadas a la obtención de una materia prima (uvas) y/o productos derivados (vinos y orujos) de la más alta calidad posible desde el punto de vista funcional, contribuyendo al valor comercial de los vinos tintos nacionales en el mercado mundial, sumado al aporte de conocimiento que apoye la re-utilización del orujo como una fuente inocua, sustentable y natural de compuestos bioactivos.

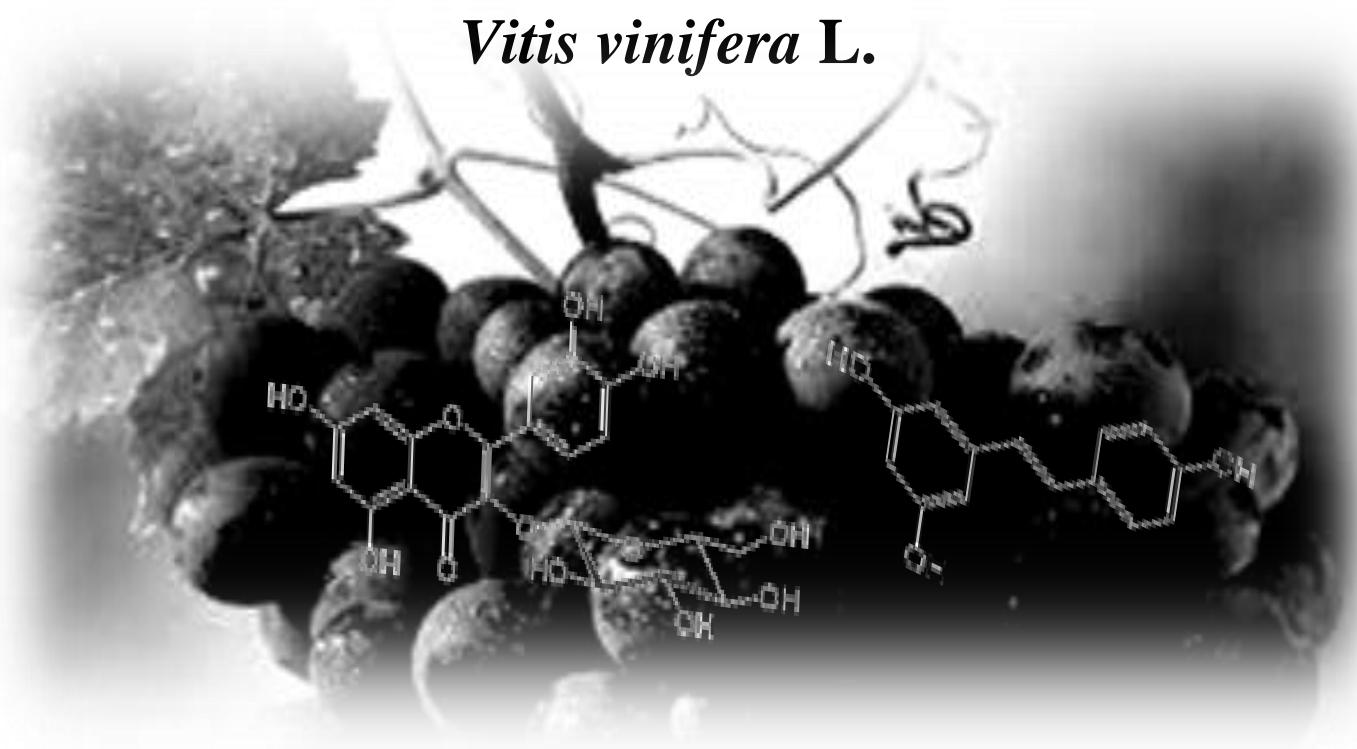
Palla cumplir con este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar los cambios en el perfil polifenólico a lo largo de la vinificación (desde la uva, como materia prima, hasta el vino como producto elaborado final) de tres variedades de uvas *Vitis vinifera* L. tintas producidas en Argentina (**CAPÍTULO 2**),
- Evaluar los cambios en la capacidad antioxidantes a lo largo de este proceso mediante ensayos *in vitro*, investigando la relación con el perfil polifenólico encontrado en cada etapa (**CAPÍTULO 3**),
- Estudiar los cambios en la capacidad antioxidante a lo largo de este proceso mediante ensayos *in vivo*, investigando la relación con el perfil polifenólico encontrado en cada etapa. Asimismo, se propone indagar sobre los mecanismos de acción a nivel celular por el cual los polifenoles ejercen su efecto sobre los sistemas biológicos (**CAPÍTULO 4**),
- Analizar la bioaccesibilidad, biodisponibilidad y capacidad antioxidante de los compuestos polifenólicos de la uva y el vino tinto, simulando la digestión gastro-intestinal humana y el posterior proceso de absorción intestinal (**CAPÍTULO 5**).

CAPÍTULO 2

CAMBIOS EN EL PERFIL POLIFENÓLICO A LO LARGO DEL PROCESO DE VINIFICACIÓN DE TRES VARIEDADES TINTAS

Vitis vinifera L.



2.1 Antecedentes

La uva tinta *Vitis vinifera* L. es una de las frutas más cultivadas en todo el mundo y representa una de las principales fuentes ricas en compuestos polifenólicos con actividad antioxidante para el hombre (Manach *et al.*, 2004).

Los compuestos polifenólicos de la uva tinta son del tipo flavonoideos y no flavonoides. Entre los primeros se destacan los antocianos, flavonoles y flavanoles; en cuanto a los segundos, destacan la presencia de ambas familias de ácidos fenólicos, AHC (ácidos hidroxicinámicos) y AHB (ácidos hidroxibenzoicos), y los estilbenos. Todos ellos se encuentran en los hollejos de las uvas, aunque la pulpa también aporta a su contenido en AHC, y las pepitas son las que principalmente contribuyen a su contenido en flavanoles y AHB (Monagas *et al.*, 2005b). Estos compuestos son transferidos al vino durante el proceso de vinificación (etapas de estrujado y triturado, maceración, y fermentación). Sin embargo, como la mayoría de los polifenoles de la uva se localizan en las partes sólidas de la baya (piel y semillas), una elevada proporción aún permanece en el orujo. Actualmente, una especial atención se le está dando a la explotación de este subproducto, ya que representa una fuente económica, natural y abundante para la obtención de compuestos polifenólicos antioxidantes con potencial aplicación en el desarrollo de alimentos funcionales (Fontana *et al.*, 2013).

Desde la uva, como materia prima, hasta la obtención del vino, producto final, varios factores, incluyendo la variedad de la uva, su madurez, las condiciones ambientales y geográficas de cultivo y el procedimiento tecnológico empleado durante la vinificación, afectan cuali y cuantitativamente la composición fenólica de los productos (Garrido & Borges, 2013).

Si bien en bibliografía existen un gran número de trabajos sobre la composición polifenólica de los vinos tintos y su relación con el proceso de vinificación, su estudio siempre ha representado un desafío para la comunidad científica debido a la complejidad y gran diversidad de estos compuestos en los vinos tintos (Borazan & Bozan, 2013). Así por ejemplo, Atanacković *et al.* (2012) observaron que el contenido de *trans*-resveratrol en los vinos fue dependiente de la variedad de la uva y no así de la técnica enológica empleada. Por otro lado, demostraron que el proceso de termovinificación incrementó la concentración de polifenoles totales en los vinos. Por su parte, Ginjom *et al.* (2011) encontraron que la mayoría de los 25 compuestos polifenólicos identificados en vinos tintos presentaron la máxima concentración durante la etapa de fermentación, y ésta fue estabilizada o lentamente

disminuida a partir de entonces. De manera similar, Darra *et al.* (2016) compararon tres técnicas enológicas: adición de enzimas, termovinificación y aplicación de pulsos de energía (campos eléctricos pulsados o CEP). Ellos observaron que el contenido de antocianos finalizada la fermentación alcohólica no mostró diferencias entre las tres técnicas evaluadas, sin embargo, el contenido de fenólicos y flavonoles totales fue mayor luego de la termovinificación y CEP.

La mayoría de estos estudios parten del análisis de la etapa de fermentación, y ninguno estudia los cambios desde la materia prima hasta el producto elaborado final. Asimismo, no se han encontrado trabajos de investigación publicados que estudien la evolución del completo perfil polifenólico a lo largo de todo el proceso de vinificación de variedades cultivadas en Argentina, ni sobre la caracterización química de sus orujos como una fuente potencial de compuestos bioactivos (Antoniolli *et al.*, 2015).

Por lo tanto, la caracterización de los compuestos polifenólicos y el entendimiento de los cambios que éstos sufren a lo largo del proceso de vinificación constituyen el primer paso fundamental para el estudio de la contribución al poder antioxidante, y en consecuencia, a la calidad desde el punto de vista funcional de la uva, el vino y el orujo.

En esta primera parte de la tesis se pretende identificar y cuantificar los compuestos polifenólicos en muestras tomadas a lo largo de todo el proceso de vinificación (desde la materia prima hasta el producto elaborado final) de tres variedades tintas *V. vinifera* L. cv. Syrah, Merlot y Cabernet Sauvignon producidas en Argentina, estudiar los cambios que estos compuestos sufren como consecuencia de la vinificación y evaluar las diferencias entre variedades en cada etapa del proceso analizado.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Estándares y Reactivos

Se utilizaron estándares comerciales de ácido cafeico, (+)-catequina y malvidina-3-O-glucósido obtenidos de Extrasynthèse (Genay, Francia), kaempferol y quercetina provistos por Fluka (Dorset, U.K.), ácido gálico por Riedel-de-Haën (Seelze, Germany) y miricetina, isoquercetina y *trans*-resveratrol por Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania). Para la extracción de los compuestos polifenólicos presentes en uvas y orujos se utilizó metanol anhidro (Sintorgan, Argentina) y ácido clorhídrico (J. T. Baker, México) grado analítico. Para la determinación de polifenoles totales se utilizó carbonato de sodio (Biopack, Argentina) y reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich, Suiza). En la determinación del perfil de polifenoles las fases móviles fueron preparadas con metanol grado HPLC (J. T. Baker, México) y ácido fórmico p.a. para espectroscopía de masas (Fluka, Alemania). Para filtrar las muestras antes de su inyección en el HPLC, se utilizaron filtros HVLP04700 de 0,45 µm (Millipore, São Paulo, Brasil). El agua utilizada en las determinaciones fue ultra pura (< 5 µg/L TOC y conductividad de 0,055 µS/cm) obtenida de un sistema de purificación Arium 61316-RO acoplado a un sistema Arium 611-UV (Sartorius, Alemania).

2.2.2 Muestras de estudio

Se estudiaron 3 variedades de uvas tintas *Vitis vinifera* L. cv. Syrah, Merlot y Cabernet Sauvignon, y los productos obtenidos a lo largo de la vinificación de las mismas: fermentaciones alcohólicas (intermediarias del proceso), orujos (subproducto del procesamiento), y vinos tintos varietales (producto elaborado final). Dichas muestras fueron provistas por la bodega "Antonio de la Torre" localizada en la provincia de San Juan, Argentina. Al momento en que las muestras fueron recibidas en el laboratorio, éstas se fraccionaron (uvas y orujos en bolsas; fermentaciones alcohólicas y vinos en frascos plásticos de 125 mL) y se conservaron a -80 °C hasta su análisis.

2.2.2.1 Metodología empleada para el muestreo

A continuación se describe el proceso de vinificación llevado a cabo por la bodega indicando los distintos puntos de muestreo: las variedades de uva Syrah y Merlot fueron obtenidas de parcelas sembradas en el departamento Pocito, localizado en el centro-oeste del Valle del Tulúm (31°39' de latitud sur y 68°33' de longitud oeste), mientras que las uvas Cabernet Sauvignon se obtuvieron del departamento Chimbas, localizado en el centro-norte

del Valle del Tulúm (31°29' de latitud sur y 68°30' de longitud oeste). Los racimos de uvas fueron cosechados en 2012 en su momento óptimo de maduración (22 a 25 °Brix), y transportados a la bodega para su procesamiento. Un total de 9 racimos de **uvas** se dividieron en tres bolsas de plástico negras por cada variedad y fueron inmediatamente enviados bajo refrigeración (4-8 °C) y protegidas de la luz al laboratorio para su estudio.

El proceso de vinificación en la bodega se llevó a cabo en tanques de acero de 75.000 L recubiertos con pintura epoxi (sin contacto con roble). Se realizaron tres fermentaciones independientes por cada variedad, empleándose el mismo procedimiento para todas las variedades estudiadas. Para ello, luego del despalillado y estrujado de las uvas, se agregó dióxido de azufre en una concentración de 30 mg/ L. Posteriormente, 2 mL/ hL de enzimas pectinolíticas (Endozym Rouge Liquid, Francia) fueron incorporadas a los mostos, realizándose una maceración clásica de dos días a 23-25 °C. Finalizado este tiempo, las levaduras (Zymaflore XPURE, Laffort, Portugal) fueron inoculadas en una concentración final de 1.10^7 células/ mL, iniciando la fermentación alcohólica a temperatura controlada (24-26 °C). La fermentación alcohólica finalizó cuando la concentración de azúcares fue menor a 2 g/ L, momento en el que se realizó el descube (separación del orujo del mosto fermentado). En esta etapa del proceso, de cada tanque, se tomó la muestra identificada como **fermentación alcohólica** (750 mL), la cual fue almacenada en botellas de vidrio comerciales con agregado de dióxido de azufre. También se recolectaron las muestras de **orujo** (1 kg) respectivas, las cuales se almacenaron en bolsas plásticas negras. Todas las muestras fueron inmediatamente enviadas al laboratorio para su procesamiento bajo refrigeración (4-8 °C) y protegidas de la luz.

Finalizado el descube, se produce espontáneamente la fermentación maloláctica, luego de la cual los vinos se colocan en nuevos tanques refrigerados para su estabilización. Las muestras de vino terminado fueron obtenidas luego de 4-5 meses de la fermentación primaria (o alcohólica), siendo su contenido de alcohol entre 12,0-12,5 % v/v. El contenido de SO₂ libre fue de 31, 35 y 29 mg/ L, y el contenido total de SO₂ fue de 87, 97 y 103 mg/ L en los vinos Syrah, Merlot y Cabernet Sauvignon, respectivamente. En este momento, 750 mL de **vino** terminado fue filtrado usando bentonita y almacenado en botellas de vidrio comerciales. Estas muestras fueron inmediatamente enviadas al laboratorio para su procesamiento bajo refrigeración (4-8 °C) y protegidas de la luz.

2.2.3 Preparación de las muestras para sus análisis

En el caso de las muestras líquidas, fermentaciones alcohólicas y vinos tintos varietales, los estudios de compuestos polifenólicos se llevaron a cabo sobre las muestras tal cual, sin previo procesamiento. Por el contrario, en el caso de las muestras sólidas (uvas y orujos) los análisis se realizaron a partir de los extractos polifenólicos correspondientes.

2.2.3.1 Extracción de compuestos polifenólicos de uvas y orujos

La extracción de los compuestos polifenólicos de las uvas enteras (previamente seleccionadas y cuidadosamente despalladas, lavadas con agua y secadas con papel) y orujos se llevó a cabo de acuerdo a la metodología propuesta por Poudel *et al.* (2008) con modificaciones menores. Brevemente, las muestras de uva y orujo fueron liofilizadas y su porcentaje de humedad se calculó por diferencia de peso antes y después de la liofilización. El porcentaje de humedad osciló entre 69-72 % para las uvas y 49-52 % para los orujos. Las muestras liofilizadas fueron inmediatamente congeladas con nitrógeno líquido y molidas en un molinillo hasta obtener un polvo fino. Para la extracción de los compuestos polifenólicos 1,0 g de muestra se homogeneizó con 15 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 2.058 x g durante 10 min. El sobrenadante obtenido fue separado, y el sedimento sólido re-extraído con 5 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.

2.2.4 Determinación de Compuestos Polifenólicos

2.2.4.1 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 μL de agua ultra pura y 90 μL de metanol en un tubo de Khan, se añadieron 20 μL de muestra apropiadamente diluida y luego se agregaron 100 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu. La mezcla obtenida se agitó en un vortex (Decalab, Argentina). Luego de exactamente 1 min, se agregaron 300 μL 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 y orujo se expresaron como miligramos de polifenoles equivalentes al ácido gálico en 100 g de peso seco de muestra (mg EAG/ 100 g). En el caso de las fermentaciones alcohólicas y los vinos, los resultados se informaron como miligramos de polifenoles equivalentes al ácido gálico en 1 L de muestra (mg EAG/ L).

2.2.4.2 Perfil de polifenoles por HPLC-DAD-ESI-QTOF

El perfil de compuestos polifenólicos en las muestras en estudio se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficacia con detección UV-VIS y espectrometría de masas en tándem (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 μm , 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 de acuerdo al gradiente que se muestra en la **Tabla 2.1**. 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 µL.

Tabla 2.1. Gradiente cromatográfico utilizado para la separación de compuestos polifenólicos.

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	80	20
3	50	50
8	50	50
15	30	70
20	30	70
21	20	80
30	20	80
31	80	20
41	80	20

El sistema de HPLC se acopló a un detector UV-VIS por arreglo de diodos (DAD) Agilent G1315 C Starlight DAD, conectado en tándem a un espectrómetro de masas de alta resolución (micrOTOF, Serie QII, Bruker Daltonics, USA) 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 para obtener espectros de MS/MS 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 (Bruker Daltonics, 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 su tiempo de retención, espectro UV-VIS, masa exacta, espectro 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 malvidina-3-O-glucósido, isoquercetina, quercetina, kaempferol, miricetina, (+)-catequina, ácido cafeico, ácido gálico y *trans*-resveratrol, 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) instrumentales se evaluaron experimentalmente considerando una relación señal/ruido de 3 y 10 respectivamente. Los LD y LC fueron los siguientes: malvidina-3-O-glucósido = 0,0013 y 0,0004 mg/ L; isoquercetina = 0,0025 y 0,0008 mg/ L; quercetina = 0,0023 y 0,0007 mg/ L; kaempferol = 0,0020 y 0,0006 mg/ L; miricetina = 0,0021 y 0,0006 mg/ L; (+)-catequina = 0,010 y 0,003 mg/ L; ácido cafeico= 0,030 y 0,009 mg/ L; ácido gálico = 0,03 y 0,01 mg/ L; y *trans*-resveratrol = 0,0025 y 0,0008 mg/ L, respectivamente. La precisión 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.

2.2.5 Análisis Estadísticos de los datos

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

2.2.5.1 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 este capítulo los valores obtenidos en las diferentes determinaciones analíticas son expresados como la media \pm desviación estándar.

2.2.5.2 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 las determinaciones analíticas 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.

2.2.5.3 Estadística Multivariada

La estadística multivariada se utiliza para evaluar simultáneamente tres o más variables medidas en una misma muestra, permitiendo lograr una interpretación más eficiente de la variabilidad de los datos.

2.2.5.3.1 Análisis de Componentes Principales (ACP)

Es una técnica que permite hacer un análisis exploratorio de los datos, permitiendo descubrir y resaltar la información contenida en una matriz multidimensional de datos. El ACP analiza la interdependencia de variables métricas y encuentra una representación gráfica óptima de la variabilidad de los datos. Este análisis examina todos los datos en un espacio de menor dimensión que el espacio original de las variables, y trata de encontrar, con mínima pérdida de información, un nuevo conjunto de variables (componentes principales) no correlacionadas que expliquen la estructura de la variación entre objetos y variables.

El ACP se aplicó para evaluar la relación entre el perfil fenólico (agrupado por familias de compuestos) y la variedad en cada tipo de muestra estudiada.

2.3 Descripción de los resultados y discusión

Se determinó el contenido de polifenoles totales (PT), por medio del método de Folin-Ciocalteu, y el perfil de polifenoles mediante HPLC-DAD-ESI-MS/MS, a lo largo de la vinificación de *V. vinifera* L. cv. Syrah, Merlot y Cabernet Sauvignon. Las muestras analizadas fueron la uva, orujo, fermentación alcohólica y vino. Los vinos y las fermentaciones se analizaron sin tratamiento previo, mientras que para uvas y orujos, se realizó un extracto de sus compuestos polifenólicos para su análisis.

2.3.1 Contenido de polifenoles totales (PT)

La **Figura 2.1** muestra el contenido de PT en las muestras tomadas a lo largo de la vinificación de las tres variedades tintas *V. vinifera* L. estudiadas.

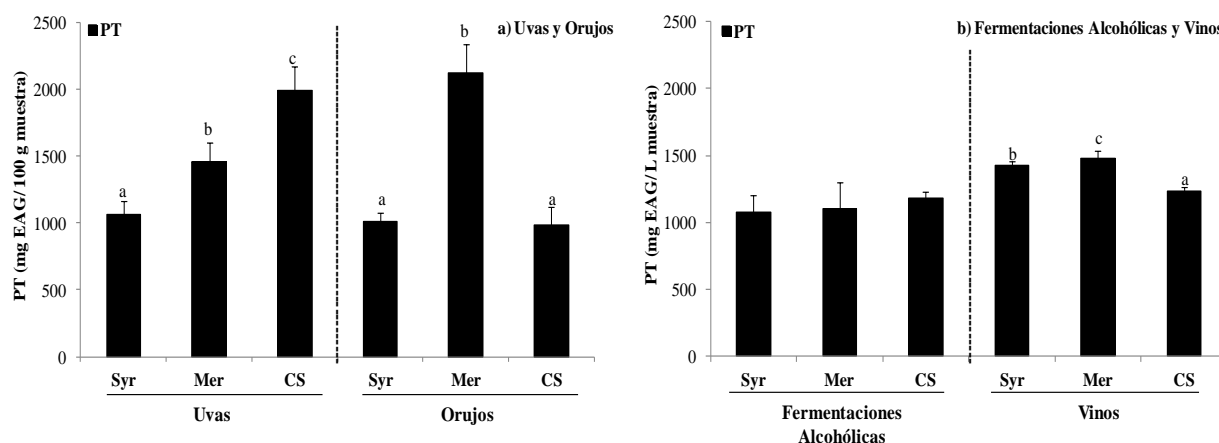


Figura 2.1. Contenido de Polifenoles Totales (PT) en muestras tomadas a lo largo de la vinificación de tres variedades tintas *V. vinifera* L. a) Uvas y Orujos; b) Fermentaciones alcohólicas y Vinos. Contenido de PT expresados en: mg GAE/ 100 g peso seco para uvas y orujos; mg GAE/ L para fermentaciones alcohólicas y vinos. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) entre variedades.

El contenido de PT en las uvas varió entre 1062-1986 mg GAE/ 100 g de peso seco, lo cual concuerda con los valores encontrados por otros autores para uvas de calidad enológica (Lee & Rennaker, 2011; Yang *et al.*, 2009). Este contenido mostró diferencias estadísticas entre variedades, siendo Cabernet Sauvignon y Syrah las que mostraron los valores más altos y más bajos respectivamente. A lo largo del proceso de vinificación, estos compuestos son extraídos de la uva, durante las etapas de maceración y fermentación, y de esta manera son transferidos al vino. Sin embargo, debido a que provienen de las partes sólidas de la uva, una proporción permanece remanente en el orujo. El contenido de PT en los orujos varió entre 985-2122 mg GAE/ 100 g de peso seco, valores que concuerdan con los informados por otros autores para orujos de diferentes variedades *V. vinifera* L. (Antoniolli *et al.*, 2015; Makris *et al.*, 2007; García-Becerra *et al.*, 2016). Entre las variedades estudiadas, Merlot demostró el

mayor contenido, que fue incluso significativamente ($p < 0,0001$) mayor respecto al encontrado en su materia prima. Este último resultado podría deberse a que la transferencia de los compuestos polifenólicos durante la elaboración del vino no implica solo una simple partición sólido/líquido, sino que además otros procesos físicos, químicos y enzimáticos podrían estar modulando dicha transferencia (Barcia *et al.*, 2014a; Barcia *et al.*, 2014b; Monagas *et al.*, 2005a). Por otro lado, Thimothe *et al.* (2007) también encontraron mayores contenidos de PT en orujos respecto de su materia prima para diferentes variedades *V. vinifera* producidas en Nueva York, siendo estos hasta 2,5 veces mayores. Alrededor del 70 % de los polifenoles de la uva se encuentra en las semillas (Ivanova *et al.*, 2011a; Singleton, 1982; Singleton & Esaú, 1969). Por lo tanto, nuestros resultados podrían deberse también a una mayor proporción de semillas presentes en los orujos de la variedad Merlot. Cuando analizamos el contenido de PT en las muestras líquidas, observamos que para las fermentaciones alcohólicas varió entre 1075-1177 mg EAG/ L sin diferencias entre variedades, y este valor fue levemente incrementado hasta la obtención del vino, mostrando valores entre 1230-1475 mg EAG/ L (Granato *et al.*, 2010; Stasko *et al.*, 2007). Entre las variedades estudiadas, Merlot fue el vino con mayor contenido de PT, mientras que Cabernet Sauvignon demostró el menor contenido.

De acuerdo a los resultados obtenidos, ninguna variedad se caracterizó por el mayor contenido de PT a lo largo de todo el proceso de vinificación, sino que éste fue dependiente de la etapa del proceso analizado. Estos cambios en el contenido de PT a lo largo de la vinificación, son indicativos de que importantes transformaciones (cambios cuali y cuantitativos) podrían estar ocurriendo en el perfil que lo constituye y, por lo tanto, terminarían influyendo en la capacidad antioxidante demostrada por la variedad en cada etapa.

2.3.2 Identificación de compuestos polifenólicos por HPLC-DAD-ESI-QTOF

Un total de 45 compuestos pertenecientes a las familias de antocianos, flavonoles, flavanoles, ácidos hidroxicinámicos (AHC) e hidroxibenzoicos (AHB) y estilbenos fueron identificados teniendo en cuenta: tiempo de retención, espectro UV-VIS, masa exacta, espectro MS/MS, comparados a su vez con compuestos descritos en la literatura y con estándares de referencia (**Tablas 2.2 y 2.3**).

Tabla 2.2. Datos cromatográficos y espectrales de los antocianos identificados en las muestras estudiadas.

N°	Nombre del Compuesto	Abreviatura	t _r (min)	Fórmula Molecular	[M] ⁺ experimental (m/z)	[M] ⁺ calculado (m/z)	Error (ppm)	Fragmentos MS/MS (m/z)	λ _{max} (nm)	Muestra
1	Delfinidina-3-O-glucósido	Dp-3-O-glc	11,4	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	465,1034	465,1028	-1,4	303	529	U, F, V
2	Cianidina-3-Oglucósido	Ci-3-O-glc	11,7	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449,1060	449,1078	4,0	287	530	U, F, V
3	Petunidina-3-O-glucósido	Pt-3-O-glc	11,8	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₂	479,1222	479,1184	-7,9	317	531	U, O, F, V
4	Peonidina-3-O-glucósido	Pn-3-O-glc	12,3	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁	463,1257	463,1235	-4,7	301	530	U, O, F, V
5	Malvidina-3-O-glucósido *	Mv-3-O-glc	12,4	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂	493,1392	493,1341	-10,4	331	530	U, O, F, V
6	Delfinidina-3-O-acetilglucósido	Dp-3-O-acglc	12,9	C ₂₃ H ₂₃ O ₁₃	507,1148	507,1133	-3,0	303	529	U, F, V
7	Cianidina-3-O-acetilglucósido	Ci-3-O-acglc	13,7	C ₂₃ H ₂₃ O ₁₂	491,1162	491,1184	4,5	287	533	U
8	Petunidina-3-O-acetilglucósido	Pt-3-O-acglc	13,9	C ₂₄ H ₂₅ O ₁₃	521,1277	521,1290	2,4	317	528	U, O, F, V
9	Malvidina-3-O-acetilglucósido	Mv-3-O-acglc	15,0	C ₂₅ H ₂₇ O ₁₃	535,1515	535,1446	-12,8	331	531	U, O, F, V
10	Peonidina-3-O-acetilglucósido	Pn-3-O-acglc	15,2	C ₂₄ H ₂₅ O ₁₂	505,1382	505,1341	-8,2	301	524	U, O, F, V
11	Malvidina-3-O-cafeoilglucósido	Mv-3-O-cafglc	16,9	C ₃₂ H ₃₁ O ₁₅	655,1641	655,1657	2,6	331	536	U, O
12	Delfinidina-3-O-cumaroilglucósido	Dp-3-O-cmglc	17,4	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₄	611,1404	611,1395	-1,4	303	533	U, O
13	Coumaroilvitisin B		17,5	C ₃₄ H ₃₁ O ₁₄	663,1800	663,1708	-13,9	355	525	O
14	Petunidina-3-O-cumaroilglucósido	Pt-3-O-cmglc	18,8	C ₃₁ H ₂₉ O ₁₄	625,1531	625,1552	3,4	317	535	U, O, F, V
15	Malvidina-3-O-cumaroilglucósido	Mv-3-O-cmglc	19,6	C ₃₂ H ₃₁ O ₁₄	639,1798	639,1708	-14,0	331	533	U, O, F, V
16	Peonidina-3-O-cumaroilglucósido	Pn-3-O-cmglc	19,9	C ₃₁ H ₂₉ O ₁₃	609,1621	609,1603	-3,1	301	531	U, O, F, V
17	Pigmento A		21,3	C ₃₁ H ₂₉ O ₁₃	609,1610	609,1603	-1,2	447	508	O, F, V
18	Acetil Pigmento A		21,8	C ₃₃ H ₃₁ O ₁₄	651,1689	651,1708	-2,9	447	510	O, F, V

Abreviaturas: t_r, tiempo de retención; λ_{max}, longitud de onda máxima; Dp, delfinidina; Ci, cianidina; Pt, petunidina; Pn, peonidina; Mv, malvidina; glc, glucósido; ac, acetil; caf, cafeoil; cm, cumaroil; U, uva; O, orujo; F, fermentación alcohólica; V, vino. Compuesto marcado con * fue identificado con estándar auténtico.

Tabla 2.3. Datos cromatográficos y espectrales de los flavonoles, flavanoles, AHC, AHB y estilbenos identificados en las muestras estudiadas.

Nº	Nombre del Compuesto	Abreviatura	Familia Fenólica	t _r (min)	Fórmula Molecular	[M-H] ⁻ experimental (m/z)	[M-H] ⁻ calculado (m/z)	Error (ppm)	Fragmentos MS/MS (m/z)	λ _{max} (nm)	Muestra
19	Ácido Gálico *		AHB	10,8	C ₇ H ₅ O ₅	169,0113	169,0142	17,6	125	274	F, V
20	Dímero de Procianidina		Flavanol	10,9	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	577,1347	577,1351	0,7	451, 425, 407, 289	278	U, O, F, V
21	Dímero de Procianidina monogalato		Flavanol	11,7	C ₃₇ H ₂₉ O ₁₆	729,1435	729,1461	3,6	577, 559, 441, 407	278	U, O
22	(+)-Catequina *		Flavanol	12	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	289,0727	289,0718	-3,4	245	281	U, O, F, V
23	Ácido Caftárico		AHC	12,2	C ₁₃ H ₁₁ O ₉	311,0420	311,0409	-3,8	179, 149	333, h 280	U, O, F, V
24	(-)-Epicatequina		Flavanol	12,8	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	289,0707	289,0718	3,6	245	281	U, O, F, V
25	Ácido Coutárico		AHC	13,3	C ₁₃ H ₁₁ O ₈	295,0468	295,0459	-3,0	163, 149	315, h 285	U, O, F, V
26	(-)-epicatequin-3-O-galato		Flavanol	13,4	C ₂₂ H ₁₇ O ₁₀	441,0841	441,0827	-3,2	289, 169	282	U, O
27	Ácido Fertárico		AHC	13,5	C ₁₄ H ₁₃ O ₉	325,0594	325,0560	-10,5	193	319, h 282	U
28	Ácido Cafeico *		AHC	14,2	C ₉ H ₇ O ₄	179,0327	179,0350	12,7	135	325, h 292	F, V
29	Miricetina-3-O-glucósido	Mir-3-O-glc	Flavonol	15,7	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₃	479,0876	479,0831	-9,3	316, 317	355	U, O, F, V
30	Miricetina-3-O-glucurónido	Mir-3-O-glcr	Flavonol	15,8	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₄	493,0636	493,0624	-2,5	317	354	U, O, F, V
31	Etil galato		AHB	16,0	C ₉ H ₉ O ₅	197,0435	197,0455	10,5	169	278	O, F, V
32	Astilbina		Flavonol	17,8	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449,1097	449,1089	-1,8	303, 285	323	U, O, F, V
33	Laricitrina-3-O-glucósido	Lar-3-O-glc	Flavonol	18,3	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₃	493,0997	493,0988	-1,9	331, 315, 179	356	U, O, F, V
34	Isoquercetina *		Flavonol	18,5	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	463,0837	463,0882	9,7	301	354, h 300	U, O, F, V
35	Quercetina-3-O-glucurónido	Quer-3-O-glcr	Flavonol	18,6	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃	477,0687	477,0675	-2,7	301	354	U, O, F, V
36	<i>trans</i> -Resveratrol *		Estilbeno	19,1	C ₁₄ H ₁₁ O ₃	227,0715	227,0714	-0,8	185	312	U, F, V
37	Kaempferol-3-O-glucósido	Kp-3-O-glc	Flavonol	20,3	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	447,0942	447,0933	-2,0	284, 255	357	U
38	Siringetina-3-O-glucósido	Sir-3-O-glc	Flavonol	20,5	C ₂₃ H ₂₃ O ₁₃	507,1168	507,1144	-4,6	345	355	U, O, F, V
39	Isorhamnetina-3-O-glucósido	Isorh-3-O-glc	Flavonol	20,8	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂	477,1052	477,1038	-2,8	314, 315	354	U, O, F, V
40	Miricetina *		Flavonol	20,8	C ₁₅ H ₉ O ₈	317,0301	317,0303	0,7	179	373, h 302	U, O, F, V
41	Quercetina *		Flavonol	23,7	C ₁₅ H ₉ O ₇	301,0360	301,0354	-2,2	179, 151	370, h 301	
42	Laricitrina		Flavonol	24,1	C ₁₆ H ₁₁ O ₈	331,0461	331,0459	-0,5	316, 179	372	U, O, F, V
43	Kaempferol *		Flavonol	26,6	C ₁₅ H ₉ O ₆	285,0416	285,0405	-4,0	257	372, h 321	U, O, F, V
44	Siringetina		Flavonol	27,1	C ₁₇ H ₁₃ O ₈	345,0618	345,0616	-0,6	330, 315	371	U, O, F, V
45	Isorhamnetina		Flavonol	27,2	C ₁₆ H ₁₁ O ₇	315,0508	315,0510	0,7	300	371	U, O, F, V

Abreviaturas: t_r, tiempo de retención; λ_{max}, longitud de onda máxima; Mir, miricetina; Lar, laricitrina; Quer, quercetina; Kp, kaempferol; Sir, siringetina; Isorh, isorhamnetina; glc, glucósido; glcr, glucurónido; AHC, ácido hidroxicinámico; AHB, ácido hidroxibenzoico; h, hombro; U, uva; O, orujo; F, fermentación alcohólica; V, vino. Compuestos marcados con * fueron identificados con estándares auténticos.

2.3.2.1 Antocianos

Como se observa en la **Tabla 2.2**, un total de 18 antocianos se identificaron en las muestras estudiadas. Los antocianos son derivados glicosilados de las antocianidinas (**Figura 1.2, Sección 1.3.1.1**) y es la forma en la que principalmente se los encuentra en la naturaleza. Estos pueden ser identificados por medio de su absorbancia característica en la región visible del espectro. A valores de pH ácidos este máximo de absorción varía en el intervalo de longitudes de onda de 465-560 nm. Estos compuestos son pigmentos naturales, responsables del color rojo/ púrpura que confieren a las plantas en las que se encuentran.

Los primeros cinco compuestos (**1, 2, 3, 4 y 5**) identificados presentaron iones moleculares de m/z 465, 449, 479, 463 y 493, respectivamente; además presentaron máximos de absorbancia entre 529-530 nm, característico de los antocianos. El análisis MS/MS de estos iones dio lugar a un ion $[M-162]^+$, generado por la pérdida de una ciclohexosa. En *V. vinifera* L. los antocianos son exclusivamente monoglicosilados y esta sustitución ocurre específicamente por esterificación en la posición 3 del anillo C por una molécula de glucosa (Núñez *et al.*, 2004). Por lo tanto, el ion $[M-162]^+$ se asoció a la pérdida de una glucosa y los iones precursores de estos cinco compuestos correspondieron a los derivados 3-O-glucosilados de delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina, respectivamente (Alcalde-Eon *et al.*, 2006). Adicionalmente, la identificación del compuesto **5** 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.

En *V. vinifera* L. la glucosa de los antocianos puede estar a su vez esterificada en el C6 por los ácidos acético, *p*-cumárico, o cafeico (Núñez *et al.*, 2004). En este sentido, los compuestos **6, 7, 8, 9 y 10** mostraron en su espectro de MS/MS el ion $[M-204]^+$, correspondiente a los cinco aglicones anteriormente identificados luego de la pérdida del sustituyente acetilglucósido. De la misma manera, el compuesto **11** se identificó como malvidina-3-O-cafeoilglucósido, ya que su espectro MS/MS mostró el $[M-324]^+$, correspondiente al ion del aglicón de malvidina luego de la pérdida del sustituyente cafeoilglucósido. Finalmente, los compuestos **12, 14, 15 y 16** correspondieron a los derivados cumaroilglucosilados, debido a que sus análisis MS/MS mostraron al ion $[M-308]^+$, correspondiendo a la pérdida de la glucosa esterificada con ácido *p*-cumárico. Estos derivados acilados mostraron un espectro visible característico de los antocianos, con máximo de absorbancia entre 524-536 nm.

El compuesto **13**, con un espectro visible característico de los antocianos, presentó un ión de m/z 663; su análisis MS/MS dio lugar al ion $[M-308]^+$, sugiriendo la pérdida de un sustituyente cumaroilglucósido. Teniendo en cuenta dichas características espectrales y su orden de elución este compuesto fue identificado como cumaroilvitisin B, lo cual está de acuerdo con lo publicado por Bakker *et al.*, (1997) y Vivar-Quintana *et al.*, (2002).

Finalmente, los compuestos **17** y **18** mostraron iones precursores con m/z 609 y 651 respectivamente, y dieron lugar al mismo ion fragmento de m/z 447, sugiriendo la pérdida de una glucosa ($[M-162]^+$) en el primer caso y una acetilglucosa ($[M-204]^+$) en el segundo. Estos compuestos mostraron máximos de absorbancia a 508 y 510 nm, respectivamente. De acuerdo a estas características espectrales y sus órdenes de elución estos compuestos se identificaron como pigmento A y acetil pigmento A, respectivamente. Ambos con un desplazamiento hipsocrómico en el máximo de absorbancia de la región visible del espectro comparado al de sus respectivos antocianos precursores (malvidina-3-O-glucósido y malvidina-3-O-acetilglucósido, respectivamente) (de Villers *et al.*, 2004).

2.3.2.2 Flavonoles

De los 27 compuestos identificados por ionización en modo negativo, 15 fueron flavonoles (**Tabla 2.3**). Estos compuestos en la naturaleza se encuentran principalmente unidos a un azúcar, mientras que sus respectivos aglicones pueden derivar por ejemplo del procesamiento de los alimentos. En *V. vinifera* L. la glicosilación de los flavonoles ocurre exclusivamente por esterificación en la posición 3 del anillo C (**Figura 1.2, Sección 1.3.1.1**) (Castillo-Muñoz *et al.*, 2007).

Los compuestos **29**, **37** y **39** presentaron espectros UV característicos de flavonoles, con máximos de absorbancias entre 354-357 nm. La fragmentación de sus iones moleculares, de m/z 479, 447 y 477 respectivamente, dio lugar a la pérdida de 163 unidades de masa en todos los casos con la consecuente formación del respectivo radical aglicón ($[Y_0-H]^\bullet$) como pico base: 316, 284 y 314. La observación del $[Y_0-H]^\bullet$ como pico base en el patrón de fragmentación es indicativo de la pérdida de una hexosa en el C3 del anillo C de este tipo de compuestos (Ablajan *et al.*, 2006). Toda esta información permitió identificar a los iones moleculares como 3-O-glucósidos de miricetina, kaempferol e isorhamnetina, respectivamente (Downey & Rochfort, 2008).

El compuesto **33** mostró un espectro UV característico de flavonoles, con máximo de absorbancia a 356 nm. Su ion molecular presentó una m/z de 493 y su fragmentación dio lugar al ion m/z 331 ($[M-H-162]^-$) como pico base, sugiriendo la pérdida de una glucosa, junto con los iones de m/z 315 y 179, asociados a la pérdida de un $-CH_3$, y correspondiente al aligón de miricetina, respectivamente. Teniendo en cuenta toda esta información el compuesto **33** fue identificado como laricitrina-3-O-glucósido (o metilmiricetina-3-O-glucósido), resultado que está de acuerdo con lo publicado por Downey & Rochfort (2008) y Castillo-Muñoz *et al.* (2009).

Por su parte, los compuestos **34** y **38**, con máximos de absorbancia a 354 y 355 nm, presentaron un ion molecular de m/z 463 y 507, respectivamente. La fragmentación de dichos iones precursores dio lugar al ion con m/z 301 y 345 respectivamente, sugiriendo la pérdida de una glucosa ($[M-H-162]^-$). Esta información permitió identificar al compuesto **34** como isoquercetina (o quercetina-3-O-glucósido) y al **38** como siringetina-3-O-glucósido (o dimetilmiricetina-3-O-glucósido), en concordancia con lo descrito por Castillo-Muñoz *et al.* (2009). Adicionalmente, la identificación del compuesto **34** 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 **30** y **35** presentaron un máximo de absorbancia a 354 nm, característico de flavonoles, y la fragmentación de sus iones moleculares (de m/z 493 y m/z 477, respectivamente) dio lugar entre su patrón de fragmentación a los iones $[M-H-176]^-$. En *V. vinifera* 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-glucurónido y quercetina-3-O-glucurónido, respectivamente (Castillo-Muñoz *et al.*, 2009).

El compuesto **32** presentó un ion molecular de m/z 449 y un espectro UV característico de flavonoles, con máximo de absorbancia a 323 nm. Su 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, lo cual estuvo de acuerdo con Ivanova *et al.* (2011b).

Los compuestos **40**, **41** y **43** presentaron un ion precursor de m/z 317, 301 y 285, respectivamente. Estos iones correspondieron a los aglicones miricetina, 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.

Los compuestos **42**, **44** y **45** mostraron un espectro UV característico de flavonoles, con máximos de absorbancia entre 371-372 nm. Sus iones precursores presentaron una m/z de 331, 345 y 315, respectivamente. La fragmentación de los mismos condujo a la formación de iones $[M-H-15]^-$, que se asociaron a la pérdida de un sustituyente $-CH_3$. Adicionalmente el compuesto **42** mostró un fragmento de m/z 179, correspondiente al aglicón de miricetina, y el compuesto **44** un fragmento de m/z 315 ($[M-H-30]^-$) asociado a la pérdida de dos sustituyentes $-CH_3$. En base a todo el análisis realizado, estos iones precursores se asignaron a las agliconas de laricitrina (o metilmiricetina), siringetina (o dimetilmiricetina), e isorhamnetina (o metilquercetina), respectivamente, y adicionalmente esta identificación fue confirmada por los trabajos realizados por Castillo-Muñoz *et al.* (2007) y a Ding *et al.* (2008).

2.3.2.3 Flavanoles

De acuerdo a la **Tabla 2.3**, un total de 5 flavanoles fueron identificados en las muestra en estudio.

Los compuestos **22** y **24** presentaron un espectro UV característico de flavanoles con el mismo máximo de absorbancia, que fue a 281 nm. Asimismo, ambos mostraron el mismo ion molecular, con m/z de 289, y dieron lugar al mismo ion fragmento, con un m/z de 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 **20**, con un máximo de absorbancia característico de flavanoles a 278 nm, presentó un ion molecular de m/z 577. Su fragmentación condujo a la formación de los iones con m/z 451, 425, 407 y 289. Considerando el orden de elución y el patrón de fragmentación demostrado, este compuesto se identificó como dímero de procianidina (Monagas *et al.*, 2003b). De la misma manera se identificó el compuesto **21**, el cual eluyó inmediatamente después del dímero de procianidina. Su ion molecular, de m/z 729, dio lugar

a los fragmentos de m/z 577, 559, 441 y 407. Este compuesto fue identificado como un dímero de procianidina monogalato (Monagas *et al.*, 2003b).

El compuesto **26**, con un máximo de absorbancia característico de flavanoles a 282 nm, 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.*, 2003b).

2.3.2.4 Ácidos Hidroxicinámicos (AHC)

Cuatro compuestos derivados de AHC se identificaron en las muestras en estudio (Tabla 2.3). Los compuestos **23**, **25** y **27**, mostraron un espectro UV característico de AHC con un máximo de absorbancia entre 319-333 nm correspondiente al grupo cinamoil (Mozetič *et al.*, 2006). La fragmentación de sus iones moleculares, de m/z 311, 295 y 325, respectivamente, dio lugar a un $[M-H-132]^-$ y un ion de m/z 149 (en el caso de los precursores de m/z 311 y 295). 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 descriptos por Kammerer *et al.* (2004) e Ivanova *et al.* (2011a). Esta información permitió identificar a estos tres compuestos como ácido caftárico, coutárico y fertárico, respectivamente.

El compuesto **28**, mostró un espectro UV característico de AHC, con un máximo de absorbancia a 325 nm, y 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.*, 2007). 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.

2.3.2.5 Ácidos Hidroxibenzoicos (AHB)

En las muestras analizadas lograron identificarse solo dos compuestos derivados de AHB (Tabla 2.3). El compuesto **19**, 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. Este compuesto mostró un máximo de absorción en la región UV del espectro a 274 nm, correspondiente al grupo benzoil, 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.*, 2007).

Por otro lado, el compuesto **31** 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.* (2003b).

2.3.2.6 Estilbenos

Dentro de esta familia de compuestos solamente se identificó el *trans*-resveratrol (compuesto **36**) y las características espectrales obtenidas para dicho compuesto estuvieron en concordancia con las observadas por otros autores (Vergara *et al.*, 2011). Su ion molecular mostró un m/z de 227, con un máximo de absorbancia a 312 nm, y su fragmentación dio lugar al ion de m/z 185. Adicionalmente, la identificación del *trans*-resveratrol 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.

2.3.3 Cambios en el perfil de polifenoles a lo largo de la vinificación

El contenido de las familias fenólicas, expresado como la sumatoria de sus constituyentes individuales, y el de cada uno de los compuestos polifenólicos identificados en las muestra tomadas a lo largo del proceso de vinificación se muestra en la **Figura 2.2** y en las **Tablas 2.4, 2.5 y 2.6**, respectivamente.

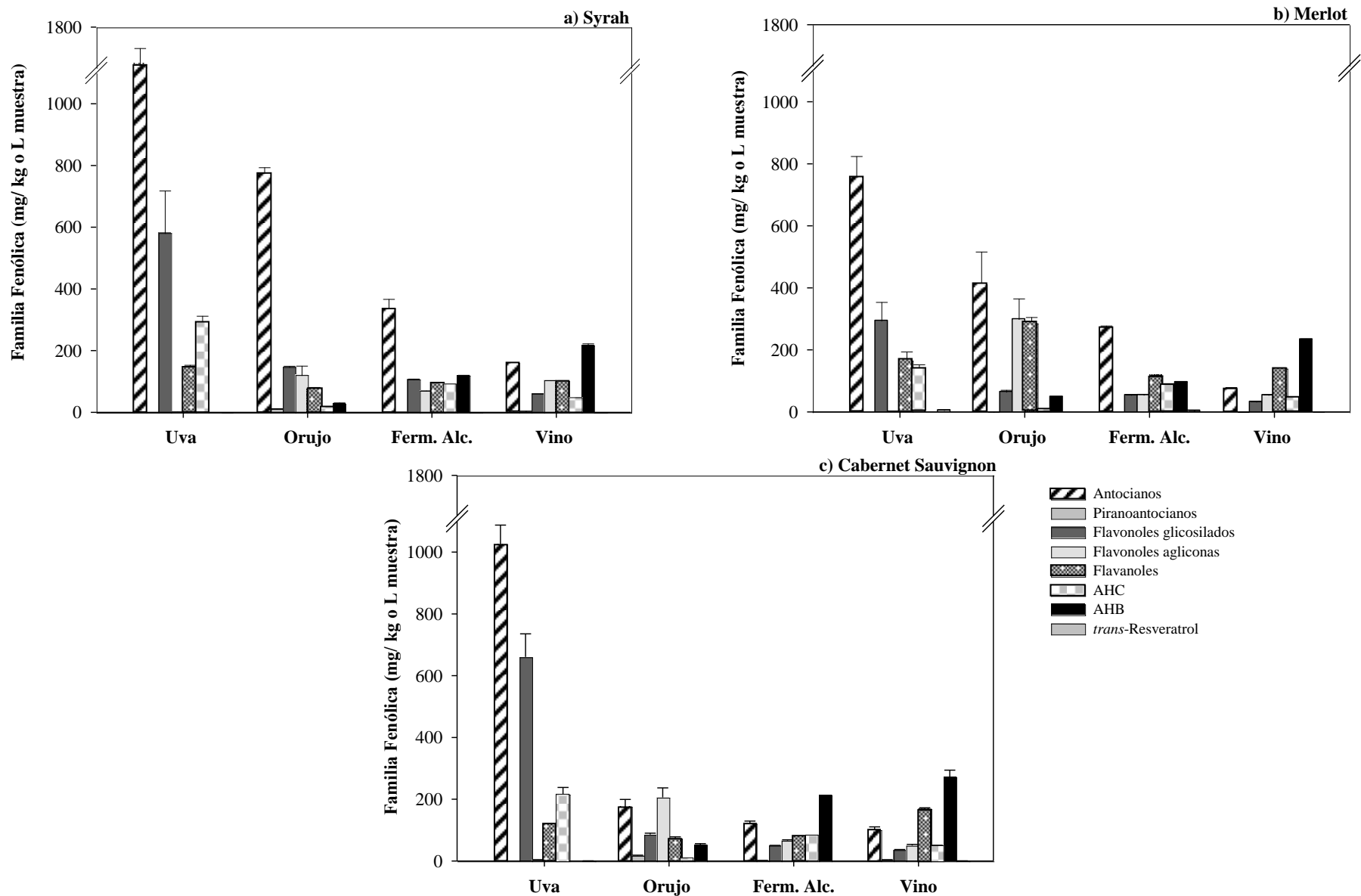


Figura 2.2. Contenido de las familias de compuestos polifenólicos en muestras tomadas a lo largo de la vinificación de tres variedades tintas *V. vinifera* L. a) Syrah; b) Merlot; c) Cabernet Sauvignon. Contenido expresado como la sumatoria de los constituyentes individuales de cada familia. Resultados expresados en: mg/kg peso seco para uvas y orujos; mg/L para fermentaciones alcohólicas y vinos. Abreviaturas: AHC, ácidos hidroxicinámicos; AHB, ácidos hidroxibenzoicos; Ferm. Alc.; fermentación alcohólica.

Tabla 2.4. Contenido de antocianos en muestras tomadas a lo largo de la vinificación de tres variedades tintas *V. vinifera* L.

	Uvas			Orujos			Fermentaciones Alcohólicas			Vinos		
	Syrah	Merlot	Cabernet Sauvignon	Syrah	Merlot	Cabernet Sauvignon	Syrah	Merlot	Cabernet Sauvignon	Syrah	Merlot	Cabernet Sauvignon
Dp-3-O-glc	3,30 ± 0,15Bb	6,91 ± 1,92Bc	1,59 ± 0,36Ba	<LD A	<LD A	<LD A	1,33 ± 0,02Bb	1,51 ± 0,01Bc	0,45 ± 0,02Ba	0,70 ± 0,02Ab	0,65 ± 0,12Ab	0,17 ± 0,01Aa
Ci-3-O-glc	0,70 ± 0,27Ba	1,78 ± 0,06Bb	0,79 ± 0,15Ba	<LD A	<LD A	<LD A	<LC	<LC	<LD	<LC	<LC	<LD
Pt-3-O-glc	24,08 ± 5,41Bb	25,05 ± 3,59Bb	7,40 ± 1,46Ba	0,87 ± 0,22Ac	0,40 ± 0,04Ab	0,09 ± 0,01Aa	4,31 ± 0,07Bc	3,44 ± 0,04Bb	1,78 ± 0,03Ba	2,45 ± 0,04Ac	1,62 ± 0,28Ab	1,01 ± 0,03Aa
Pn-3-O-glc	48,42 ± 17,62Bb	58,89 ± 5,10Bb	16,70 ± 0,49Ba	0,97 ± 0,19Ab	1,72 ± 0,16Ac	0,83 ± 0,06Aa	2,36 ± 0,02Bb	3,53 ± 0,12Bc	1,13 ± 0,02Ba	1,58 ± 0,03Ab	1,94 ± 0,31Ac	0,41 ± 0,01Aa
Mv-3-O-glc	380,46 ± 26,50Bc	251,54 ± 22,34Ba	328,86 ± 24,43Bb	142,22 ± 10,15Ac	96,83 ± 26,25Ab	55,84 ± 8,14Aa	177,47 ± 21,32Bb	163,09 ± 4,57Bb	81,70 ± 6,93Ba	87,41 ± 0,70Ac	46,65 ± 2,14Aa	68,60 ± 8,75Ab
Dp-3-O-acglc	1,86 ± 0,14Ba	3,39 ± 1,08Bb	1,28 ± 0,22Ba	<LD A	<LD A	<LD A	0,51 ± 0,03Bb	0,67 ± 0,02Bc	0,14 ± 0,03Ba	0,15 ± 0,02Ab	0,28 ± 0,03Ac	<LC Aa
Ci-3-O-acglc	0,18 ± 0,04Ba	0,65 ± 0,03Bb	0,17 ± 0,01Ba	<LD A	<LD A	<LD A	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Pt-3-O-acglc	17,68 ± 0,88Bb	19,92 ± 0,93Bc	11,62 ± 0,65Ba	0,86 ± 0,14Ac	0,39 ± 0,08Ab	0,03 ± 0,01Aa	1,24 ± 0,02Bb	1,24 ± 0,01Bb	0,43 ± 0,01Ba	0,65 ± 0,01Ac	0,52 ± 0,12Ab	0,22 ± 0,01Aa
Mv-3-O-acglc	816,78 ± 58,22Bc	258,20 ± 26,86Ba	539,01 ± 25,80Bb	195,01 ± 16,59Ac	103,69 ± 23,53Ab	28,37 ± 2,21Aa	101,45 ± 10,33Bc	69,24 ± 4,80Bb	23,03 ± 0,74Ba	49,74 ± 2,54Ac	13,58 ± 3,38Aa	21,32 ± 0,94Ab
Pn-3-O-acglc	72,53 ± 11,11Bc	47,79 ± 6,14Bb	32,08 ± 2,38Ba	1,83 ± 0,69Ab	3,31 ± 1,61Ac	0,25 ± 0,01Aa	4,23 ± 0,2Bb	4,88 ± 0,10Bc	1,60 ± 0,01Ba	2,05 ± 0,02Ab	2,11 ± 0,32Ab	0,82 ± 0,02Aa
Mv-3-O-cafglc	2,46 ± 1,06Ab	0,47 ± 0,07Aa	0,16 ± 0,03Aa	23,77 ± 4,77Bb	3,43 ± 2,60Ba	2,60 ± 0,25Ba	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Dp-3-O-cmglc	8,00 ± 0,92Ac	3,57 ± 1,13Ab	0,37 ± 0,03Ba	43,95 ± 3,47Bc	7,90 ± 4,81Bb	0,26 ± 0,05Aa	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Pt-3-O-cmglc	17,20 ± 2,18Ac	7,04 ± 1,39Ab	1,52 ± 0,62a	72,95 ± 1,22Bc	24,77 ± 10,73Bb	1,40 ± 0,51a	1,42 ± 0,10Bc	0,95 ± 0,04Bb	<LCa	<LC A	<LC A	<LD
Mv-3-O-cmglc	251,70 ± 19,07c	49,58 ± 3,94Aa	71,08 ± 9,53b	238,94 ± 4,75c	142,79 ± 31,36Bb	67,54 ± 10,16a	37,30 ± 0,33Bc	19,55 ± 1,96Bb	7,95 ± 0,01Ba	8,88 ± 0,06Ab	4,25 ± 0,91Aa	3,79 ± 0,05Aa
Pn-3-O-cmglc	63,86 ± 10,43Bc	23,02 ± 0,83b	13,08 ± 2,73Ba	42,71 ± 3,50Ac	24,62 ± 6,87b	1,62 ± 0,65Aa	3,03 ± 0,06Bb	3,58 ± 0,18Bc	1,55 ± 0,02Ba	1,18 ± 0,02Ab	1,14 ± 0,24Ab	0,18 ± 0,01Aa
Pigmento A	<LD A	<LD	<LD A	0,54 ± 0,09Bb	<LCa	12,79 ± 0,47Bc	2,02 ± 0,04Ac	<LC Aa	1,62 ± 0,02Ab	4,60 ± 0,20Bc	0,51 ± 0,01Ba	3,49 ± 0,10Bb
Acetil Pigmento A	<LD A	<LD A	<LD A	0,43 ± 0,06Bb	0,10 ± 0,04Ba	4,16 ± 0,56Bc	0,54 ± 0,06Ac	<LC a	0,40 ± 0,02Ab	1,34 ± 0,09Bc	<LC a	0,80 ± 0,07Bb
Cumaroilvitisin B	<LD A	<LD A	<LD A	10,94 ± 2,13Bc	0,94 ± 0,47Ba	0,73 ± 0,04Ba	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Σ Ant-glc	456,97 ± 45,56Bb	344,17 ± 29,19Ba	355,33 ± 24,63Ba	144,05 ± 9,92Ac	98,94 ± 26,42Ab	56,76 ± 8,20Aa	185,48 ± 21,41Bb	171,56 ± 4,73Bb	85,06 ± 6,86Ba	92,15 ± 0,73Ac	50,87 ± 2,80Aa	70,19 ± 8,77Ab
Σ Ant-acglc	909,03 ± 50,40Bc	329,95 ± 33,40Ba	584,16 ± 28,80Bb	197,70 ± 17,29Ac	107,40 ± 25,22Ab	28,65 ± 2,22Aa	107,42 ± 10,09Bc	76,03 ± 4,91Bb	25,19 ± 0,72Ba	52,59 ± 2,53Ac	16,49 ± 3,85Aa	22,36 ± 0,97Ab
Σ Ant-cmglc	340,76 ± 25,34Ab	83,22 ± 6,74Aa	86,05 ± 12,71Ba	398,53 ± 10,27Bc	200,08 ± 52,95Bb	70,81 ± 11,36Aa	41,75 ± 0,39Bc	24,09 ± 2,18Bb	9,50 ± 0,01Ba	10,05 ± 0,05Ac	5,39 ± 1,15Ab	3,97 ± 0,05Aa
Σ Piranoant.	<LD A	<LD A	<LD A	11,90 ± 2,27Bb	1,04 ± 0,51Ba	17,68 ± 1,02Bc	2,56 ± 0,03Ac	<LC Aa	2,02 ± 0,03Ab	5,94 ± 0,16Bc	0,51 ± 0,01Ba	4,29 ± 0,17Bb
Σ Ant.	1709,21 ± 39,46Bc	757,81 ± 68,29Ba	1025,70 ± 61,96Bb	775,95 ± 19,41Ac	410,89 ± 106,89Ab	176,49 ± 22,86Aa	337,21 ± 31,30Bc	271,68 ± 7,46Bb	121,81 ± 7,38Ba	160,77 ± 2,23Ac	73,27 ± 7,66Aa	100,81 ± 9,53Ab

Abreviaturas: Dp, delfinidina; Ci, cianidina; Pt, petunidina; Pn, peonidina; Mv, malvidina; glc, glucósido; ac, acetil; caf, cafeoil; cm, cumaroil; Piranoant, piranoantocianos; Ant, antocianos; < LD, menor al límite de detección; < LC, menor al límite de cuantificación. Los compuestos antocianos se cuantificaron como malvidina-3-O-glucósido. Resultados expresados en: mg/ kg peso seco para uvas y orujos; mg/ L para fermentaciones alcohólicas y vinos. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre uva y orujo, y entre fermentación alcohólica y vino. Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) entre variedades.

Tabla 2.5. Contenido de flavonoles y flavanoles en muestras tomadas a lo largo de la vinificación de tres variedades tintas *V. vinifera* L.

	Uvas			Orujos			Fermentaciones Alcohólicas			Vinos		
	Syrah	Merlot	Cabernet Sauvignon	Syrah	Merlot	Cabernet Sauvignon	Syrah	Merlot	Cabernet Sauvignon	Syrah	Merlot	Cabernet Sauvignon
Kaempferol	0,05 ± 0,04Ab	<LC Aa	0,02 ± 0,01 Aa	9,83 ± 0,80Ba	34,23 ± 5,57Bc	13,85 ± 0,67Bb	0,60± 0,12b	0,78 ± 0,01Bc	0,28 ± 0,01Ba	0,48 ± 0,12c	0,42 ± 0,01Ab	<LC Aa
Miricetina	2,33 ± 0,22b	0,61 ± 0,06Aa	0,58 ± 0,14Aa	2,17 ± 0,14a	2,45 ± 0,26Ba	7,25 ± 0,42Bb	13,97 ± 0,24Ab	8,78 ± 1,07Ba	13,76 ± 0,25Bb	19,25 ± 2,22Bc	4,98 ± 0,10Aa	8,43 ± 1,63Ab
Laricitrina	0,08 ± 0,01Ac	<LC Aa	0,07 ± 0,01Ab	0,30 ± 0,03Bc	0,14 ± 0,01Ba	0,26 ± 0,02Bb	1,61 ± 0,16Bb	<LC a	2,03 ± 0,50Bc	<LC A	<LC	<LC A
Siringetina	0,09 ± 0,01Ac	0,05 ± 0,01Aa	0,07 ± 0,01Ab	0,39 ± 0,02Bb	0,20 ± 0,02Ba	0,49 ± 0,03Bc	<LC	<LC	1,76 ± 0,23 B	<LC	<LC	<LC A
Quercetina	0,38 ± 0,16Aa	2,28 ± 0,39Ab	3,18 ± 0,41Ac	92,98 ±29,47Ba	251,06±65,60Bc	163,56±31,91Bb	42,19 ± 0,91Ab	40,00 ± 0,91a	42,03 ± 2,13Bb	56,85 ± 2,34Bc	39,66 ± 1,29b	31,51 ±1,54Aa
Isorhamnetina	0,23 ± 0,11Ab	0,02 ± 0,01Aa	0,03 ± 0,01Aa	16,07 ± 1,70Bb	12,46 ± 1,47Ba	20,52 ± 3,30Bc	12,54 ± 0,23Ac	6,52 ± 0,24Aa	8,80 ± 0,35Ab	28,36 ± 0,17Bc	10,70 ± 0,25Bb	10,25 ±0,57Ba
Isoquercetina	278,51 ± 89,62Bb	174,76 ± 18,18Ba	336,17±26,41Bc	26,53 ± 1,41Ac	16,05 ± 0,80Aa	21,77 ± 1,37Ab	25,23 ± 1,75Bc	16,64 ± 0,36Bb	7,77 ± 0,20Ba	2,62 ± 0,02Aa	4,34 ± 0,12Ac	3,15 ± 0,19Ab
Mir-3-O-glc	209,61 ± 30,73Bb	75,92 ± 8,02Ba	198,93±29,59Bb	11,37 ± 0,71Ac	6,13 ± 0,46Ab	3,56 ± 0,38Aa	27,28 ± 0,30Bc	12,18 ± 0,27Bb	9,15 ± 0,61Ba	14,20 ± 0,94Ac	8,56 ± 0,15Ab	8,02 ± 0,49Aa
Mir-3-O-glcr	1,06 ± 0,05Aa	1,57 ± 0,40Bb	3,96 ± 0,13Bc	1,80 ± 0,14Bc	0,47 ± 0,08Aa	0,60 ± 0,07Ab	0,61 ± 0,04b	0,38 ± 0,02Ba	0,34 ± 0,02Ba	0,59 ± 0,05b	0,27 ± 0,11Aa	0,32 ± 0,01Aa
Astilbina	2,04 ± 1,05Aa	2,06 ± 0,05Aa	4,32 ± 0,37Bb	7,57 ± 0,22Bc	2,46 ± 0,32Ba	3,75 ± 0,32Ab	7,55 ± 0,38Bc	3,62 ± 0,02Ba	6,17 ± 0,51b	6,36 ± 0,33Ab	2,90 ± 0,01Aa	6,51 ± 0,63b
Lar-3-O-glc	4,32 ± 0,43Ab	2,21 ± 0,15Aa	5,62 ± 0,28Bc	6,37 ± 0,23Bb	2,91 ± 0,19Ba	2,95 ± 0,27Aa	8,48 ± 0,18Bc	2,98 ± 0,07Ba	4,34 ± 0,19Bb	8,17 ± 0,02Ac	2,66 ± 0,01Aa	2,97 ± 0,14Ab
Quer-3-O-glcr	10,95 ± 3,66Aa	35,18 ± 9,44b	46,79 ± 15,97b	81,42 ± 3,44Bc	31,92 ± 3,58a	38,32 ± 2,76b	15,74 ± 0,81Bb	10,99 ± 0,78Ba	11,92 ± 0,37Ba	14,48 ± 0,08Ab	8,29 ± 0,42Aa	8,19 ± 0,18Aa
Kp-3-O-glc	0,14 ± 0,07Ba	0,20 ± 0,06Ba	0,52 ± 0,22Bb	<LD A	<LD A	<LD A	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Sir-3-O-glc	25,38 ± 4,40Bb	7,16 ± 0,77Ba	29,86 ± 2,60Bc	4,90 ± 0,20Ab	4,17 ± 0,72Aa	11,97± 0,62Ac	11,38 ± 0,75Ac	4,66 ± 0,14Aa	8,50 ± 0,67Bb	13,25 ± 0,77Bb	5,32 ± 0,44Ba	5,31 ± 0,28Aa
Isorh-3-O-glc	50,24 ± 20,02Bc	11,41 ± 3,04Ba	34,46 ± 6,75Bb	7,73 ± 0,31Ac	1,96 ± 0,28Aa	2,88 ± 0,28Ab	11,33 ± 0,19Bc	4,31 ± 0,31Bb	2,52 ± 0,31Ba	2,24 ± 0,01A	2,20 ± 0,25A	2,14 ± 0,23A
Σ Flavonoles aglicones	3,16 ± 0,53Aa	2,70 ± 0,90Aa	3,93 ± 0,31Ab	121,74 ± 30,36Ba	300,54± 66,34Bc	205,93 ± 30,78Bb	70,91 ± 0,87Ac	56,07 ± 1,75a	66,39 ± 2,08Bb	104,93 ± 0,17Bc	55,77 ± 1,13b	50,18 ±3,74Aa
Σ Flavonoles glicosilados	582,23 ± 137,64Bb	295,44 ± 59,95Ba	660,63±74,64Bb	147,70 ± 3,94Ac	66,07 ± 5,84Aa	85,80 ± 4,41Ab	107,59 ± 2,71Bc	55,76 ± 0,81Bb	50,50 ± 0,18Ba	61,91 ± 0,08Ac	34,53 ± 0,10Aa	36,62 ±0,73Ab
Σ Flavonoles	585,39 ± 138,12Bb	298,14 ± 60,83Aa	664,57±74,80Bb	269,45 ± 30,27Aa	366,61± 69,26Bb	291,73 ± 31,8Aa	178,50 ± 1,83Bc	111,83 ± 0,94Ba	116,89 ± 2,26Bb	166,84 ± 0,25Ac	90,30 ± 1,23Ab	86,81 ±4,47Aa
Dímero de Procianidina	13,12 ± 1,35Bb	<LD Aa	19,71 ± 1,71Bc	10,05 ± 1,14Aa	24,62 ± 3,02Bb	8,99 ± 1,66Aa	18,14 ± 0,60Ab	19,34 ± 1,63Ab	16,29 ± 0,53Aa	19,95 ± 0,28Ba	25,31 ± 0,44Bb	28,81 ±1,28Bc
Dímero de procianidina monogalato	4,04 ± 0,48Ba	5,97 ± 1,34Ab	3,58 ± 0,21Aa	2,59 ± 0,27Aa	13,64 ± 1,99Bb	17,25 ± 1,75Bc	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
(+)-Catequina	28,70 ± 1,77Bb	20,85 ± 1,50Aa	28,37 ± 1,69Bb	21,78 ± 1,67Aa	89,73 ± 9,64Bb	19,62 ± 1,83Aa	34,27 ± 0,84Aa	46,93 ± 2,11Ab	33,59 ± 1,12Aa	41,94 ± 2,07Ba	59,45 ± 2,48Bb	74,95 ±2,00Bc
(-)-Epicatequina	74,80 ± 4,99Bc	68,09 ± 3,16Ab	57,45 ± 2,88Ba	27,19 ± 4,03Ab	112,76 ± 8,21Bc	17,29 ± 1,66Aa	39,89 ± 2,12b	52,37 ± 0,37Ac	31,82 ± 1,20Aa	40,44 ± 1,24a	55,57 ± 0,78Bb	65,57 ±2,10Bc
(-)-Epicatequin-3-O-galato	25,39 ± 2,29Ba	75,30 ± 27,86Bb	6,81 ± 0,38Aa	14,72 ± 2,84Ab	45,62 ± 6,69Ac	10,49 ± 1,15Ba	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Σ Flavanoles	146,04 ± 8,72Bb	166,56 ± 29,15Ab	115,93 ± 4,40Ba	76,3 ± 6,82Aa	286,37 ±20,44Bb	73,65 ± 4,34Aa	92,30 ± 3,56Ab	118,64 ± 0,85Ac	81,70 ± 5,63Aa	102,33 ± 3,03Ba	140,33 ± 3,71Bb	169,33 ± 2,82Bc

Abreviaturas: Mir, miricetina; Lar, laricitrina; Quer, quercetina; Kp, kaempferol; Sir, siringetina; Isorh, isorhamnetina; glc, glucósido; glcr, glucurónido; < LD, menor al límite de detección; < LC, menor al límite de cuantificación. Cuantificación de los compuestos: Mir, Lar y Sir como miricetina; Quer y Isorh como quercetina; Kp como kaempferol; flavonoles glicosilados como isoquercetina; flavanoles como (+)-catequina. Resultados expresados en: mg/ kg peso seco para uvas y orujos; mg/ L para fermentaciones alcohólicas y vinos. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre uva y orujo, y entre fermentación alcohólica y vino. Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre variedades.

Table 2.6. Contenido de compuestos fenólicos no flavonoideos en muestras tomadas a lo largo de la vinificación de tres variedades tintas *V. vinifera* L.

	Uvas			Orujos			Fermentaciones Alcohólicas			Vinos		
	Syrah	Merlot	Cabernet Sauvignon	Syrah	Merlot	Cabernet Sauvignon	Syrah	Merlot	Cabernet Sauvignon	Syrah	Merlot	Cabernet Sauvignon
Ácido Caftárico	154,73 ± 15,30Bc	100,23 ± 4,78Ba	127,55 ± 21,26Bb	1,58 ± 0,24Ab	1,80 ± 0,12Ac	0,25 ± 0,15Aa	67,38 ± 1,72Bb	69,92 ± 6,44Bb	20,15 ± 0,5Aa	28,28 ± 1,38Aa	29,87 ± 1,12Ab	35,60 ± 0,37Bc
Ácido Coutárico	136,05 ± 6,82Bc	39,00 ± 2,37Ba	84,86 ± 3,21Bb	5,41 ± 0,33Ab	5,10 ± 0,53Ab	1,38 ± 0,26Aa	17,04 ± 0,73Bc	14,85 ± 1,19Bb	6,36 ± 0,30Aa	7,90 ± 0,11Aa	8,94 ± 0,16Ab	11,02 ± 0,77Bc
Ácido Cafeico	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	7,02 ± 1,06Ab	1,21 ± 0,13Aa	19,14 ± 2,50Bc	8,38 ± 0,35Bc	1,75 ± 0,27Ba	3,50 ± 0,46Ab
Ácido Fertárico	2,62 ± 1,39B	2,72 ± 1,34B	3,62 ± 1,44B	<LD A	<LD A	<LD A	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC
Σ AHC	293,40 ± 20,61Bc	136,39 ± 17,80Ba	216,03 ± 21,98Bb	6,99 ± 0,40Ab	6,90 ± 0,58Ab	1,64 ± 0,39Aa	91,45 ± 3,51Bb	85,98 ± 7,76Bb	45,65 ± 0,98Aa	44,56 ± 1,85Ab	40,56 ± 1,01Aa	50,12 ± 0,68Bc
Ácido Gálico	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	41,67 ± 2,48Aa	45,76 ± 1,52Ab	48,89 ± 0,50Ac	62,85 ± 1,91Ba	63,58 ± 2,40Ba	75,29 ± 1,54Ab
Etil galato	<LD	<LD	<LD	28,99 ± 4,14Ba	50,49 ± 1,21Bb	53,04 ± 3,02Bb	78,38 ± 0,08Ab	52,15 ± 1,38Aa	165,63 ± 20,6Ac	155,25 ± 8,16Ba	172,03 ± 0,24Bb	197,24 ± 20,16Bc
Σ AHB	<LD	<LD	<LD	28,99 ± 4,14Ba	50,49 ± 1,21Bb	53,04 ± 3,02Bb	120,04 ± 2,40Ab	97,92 ± 0,14Aa	214,52 ± 25,90Ac	218,10 ± 6,25Ba	235,61 ± 2,16Bb	272,52 ± 21,70Bc
<i>trans</i> -Resveratrol	0,08 ± 0,06Ba	6,99 ± 1,51Bb	0,47 ± 0,06Ba	<LD A	<LD A	<LD A	0,710 ± 0,005Bb	5,76 ± 0,39Bc	0,30 ± 0,02Aa	0,498 ± 0,004Aa	1,16 ± 0,03Ac	0,61 ± 0,05Bb

Abreviaturas: AHC, ácidos hidroxicinámicos; AHB, ácidos hidroxibenzoicos; < LD, menor al límite de detección; < LC, menor al límite de cuantificación. Cuantificación de los compuestos: AHC como ácido cafeico; AHB como ácido gálico; *trans*-resveratrol como *trans*-resveratrol. Resultados expresados en: mg/ kg peso seco para uvas y orujos; mg/ L para fermentaciones alcohólicas y vinos. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre uva y orujo, y entre fermentación alcohólica y vino. Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) entre variedades.

2.3.3.1 Antocianos

Los antocianos se encuentran en la piel de la uva y son los principales compuestos responsables del color rojo de las uvas y vinos (de Villiers *et al.*, 2004; Núñez *et al.*, 2004). Como puede observarse en la **Tabla 2.4**, el perfil de antocianos de todas las muestras en estudio estuvo principalmente constituido por los derivados monoglucosilados y derivados esterificados con ácido acético y *p*-cumárico de las cinco estructuras de antocianidinas usualmente descriptas para *Vitis vinifera* L.: delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina, y malvidina.

Los antocianos fueron los compuestos polifenólicos más abundantes en las uvas, representando entre el 50 al 60 % del contenido total de los compuestos identificados (**Figura 2.2**). Los derivados de malvidina presentaron el mayor contenido en estas muestras (Figueiredo-González *et al.*, 2012; Núñez *et al.*, 2004), siendo malvidina-3-O-glucósido y malvidina-3-O-acetilglucósido los mayoritarios, seguido por malvidina-3-O-cumaroilglucósido. Por el contrario, los derivados de cianidina mostraron la menor concentración, probablemente debido a que esta antocianina es el precursor de todos los demás antocianos (Núñez *et al.*, 2004).

Luego de la elaboración del vino, una alta proporción de antocianos queda remanente en el orujo, debido a que éstos derivan de la piel de la uva (**Figura 2.2**). Como puede observarse en la **Tabla 2.4**, el contenido total de antocianos en estas muestras fue significativamente menor en comparación a la respectiva muestra de uva, siendo malvidina-3-O-cumaroilglucósido el constituyente mayoritario (Ruberto *et al.*, 2007). Se observó que algunos antocianos mostraron mayor contenido en los orujos en comparación a sus respectivas uvas, resultado que también fue observado por Barcia *et al.* (2014a) y Barcia *et al.* (2014b). Los compuestos con dicho comportamiento fueron malvidina-3-O-cafeoilglucósido y los derivados cumaroilglucosilados de delfinidina, petunidina y malvidina, y se observó principalmente en las variedades Syrah y Merlot. Este hecho podría estar relacionado a la esterificación de los respectivos antocianos glucosilados con los ácidos cafeico y *p*-cumárico durante el proceso de maceración/fermentación. Además, esta explicación es consistente con la disminución observada en los antocianos precursores monoglucosilados de la uva al orujo, sumado a la hidrólisis de los ácidos hidroxicinamoil tartárico durante la fermentación para dar lugar a ácido cafeico y *p*-cumárico como se explica en la **Sección 2.3.3.4**. Por otro lado, tres pigmentos derivados de antocianos, o piranoantocianos, se encontraron en estas muestras:

pigmento A y acetil pigmento A (derivados de la ciclo-adición de ácido *p*-cumárico decarboxilado, o 4-vinilfenol, a malvidina-3-O-glucósido y malvidina-3-O-acetilglucósido, respectivamente), y cumaroilvitisin B (resultante de la ciclo-adición de acetaldehído a malvidina-3-O-cumaroilglucósido) (de Villers *et al.*, 2004). Los piranoantocianos se forman durante y luego de la fermentación alcohólica, como resultados de la reacción de los antocianos nativos de la uva con metabolitos de la levadura, como acetaldehído, o con otros constituyentes polifenólicos del vino, tales como los ácidos hidroxicinámicos (**Figura 2.3**) (Benito *et al.*, 2011; Rentzsch *et al.*, 2010).

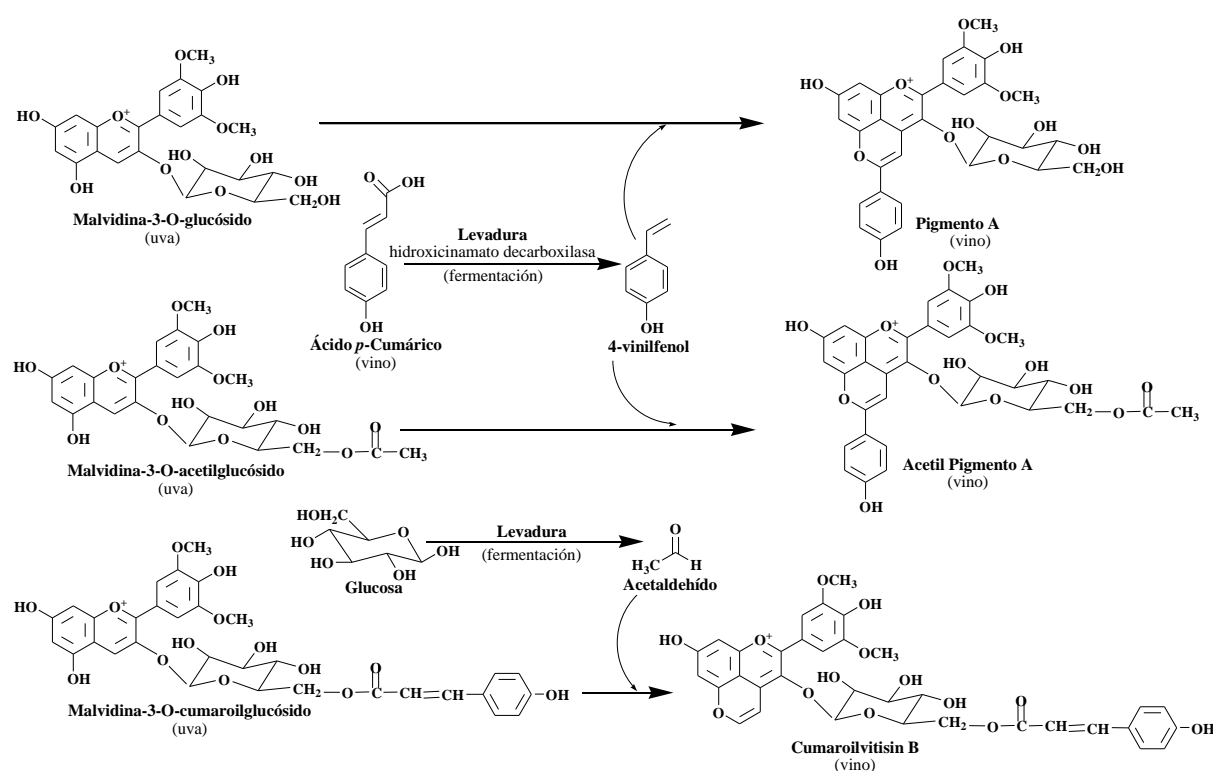


Figura 2.3. Formación de piroantocianos durante la fermentación de vinos tintos. Adaptado de Benito *et al.* (2011) y Morata *et al.* (2006).

Desde la fermentación alcohólica al vino elaborado final, el contenido total de antocianos disminuyó significativamente, a pesar de un incremento ligero pero significativo en los piranoantocianos (**Figura 2.2; Tabla 2.4**). Luego de la fermentación alcohólica hasta la obtención del vino estabilizado, los cambios en la temperatura, pH, formación de otros compuestos (por ejemplo, etanol, oxígeno, nuevos compuestos fenólicos, etc.), formación de compuestos insolubles que precipitan y la adsorción de los antocianos a las paredes celulares de las levaduras, son factores que determinan el contenido final de antocianos en el vino. En este estudio, a pesar de la formación de piranoantocianos, el contenido de antocianos disminuyó en más de un 20 % en todas las variedades en estudio, lo cual podría explicarse por adsorción a las paredes celulares de las levaduras, a la formación de complejos no solubles

entre antocianos y otros compuestos del mosto, y/o a la formación de otros compuestos derivados de antocianos que no pudieron ser detectados durante este trabajo (Barcia *et al.*, 2014a; Barcia *et al.*, 2014b; Ginjom *et al.*, 2011). Tanto en las fermentaciones alcohólicas como en los vinos, al igual que en las uvas y orujos, los derivados de malvidina mostraron el mayor contenido, siendo malvidina-3-O-glucósido el más abundante, seguido por malvidina-3-O-acetilglucósido y cumaroilglucósido (Ginjom *et al.*, 2011).

2.3.3.2 Flavonoles

Estos compuestos también se encuentran en la piel de las uvas (Castillo-Muñoz *et al.*, 2007). De acuerdo a la **Tabla 2.5**, el perfil de flavonoles de las muestras en estudio estuvo constituido por las seis estructuras flavonoideas descritas para *Vitis vinifera* L.: kaempferol, miricetina, siringetina, laricitrina, quercetina, e isorhamnetina y sus respectivos derivados monoglicosilados (Castillo-Muñoz *et al.*, 2007). Además, se observó la presencia de astilbina (dihidroquercetina-3-O-ramnósido).

Los flavonoles glicosilados fueron los segundos compuestos polifenólicos más abundantes en las uvas, representando del 20 al 30 % del contenido total de compuestos identificados (**Figura 2.2**). El flavonol glicosilado mayoritario en las uvas fue isoquercetina, seguido por miricetina-3-O-glucósido (Castillo-Muñoz *et al.*, 2007). En estas muestras, los aglicones de flavonoles representaron cantidades traza ($\leq 0,2$ %) ya que su presencia en las uvas es considerada un artefacto del método de extracción bajo condiciones ácidas (Barcia *et al.*, 2014b).

Por el contrario, los orujos, las fermentaciones alcohólicas y los vinos se caracterizaron en general por un mayor contenido en los aglicones de flavonoles, como resultado de la hidrólisis que sufren sus precursores durante el proceso de vinificación (**Figura 2.2**) (Castillo-Muñoz *et al.*, 2007; Monagas *et al.*, 2005b). El contenido total de flavonoles en los orujos fue significativamente menor en comparación a sus respectivas muestras de uvas, probablemente como resultado de la mayor transferencia de estos compuestos desde la uva al vino durante las etapas de maceración y fermentación (**Figura 2.2**). Quercetina fue el flavonol mayoritario en los orujo, fermentaciones alcohólicas y vinos, debido a que deriva de la hidrólisis de la isoquercetina (flavonol glicosilado más abundante encontrado en la materia prima) (Ruberto *et al.*, 2007).

Desde la fermentación alcohólica al vino elaborado final, el contenido de flavonoles glicosilados disminuyó significativamente junto con el contenido total de flavonoles (**Figura 2.2**). Bimpilas *et al.* (2015) atribuyó la disminución de los flavonoles glicosilados a la hidrólisis del azúcar catalizada por enzimas, como la β -glucosidasa, de las levaduras. Estos autores también observaron una disminución en el contenido de flavonoles totales, y explicaron que este hecho podría ser una consecuencia de la oxidación de estos compuestos y/o a su co-pigmentación con antocianos, aunque la adsorción a las paredes celulares de la levadura también podrían explicar nuestro resultado (Barcia *et al.*, 2014a; Barcia *et al.*, 2014b).

2.3.3.3 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.*, 2003b; Monagas *et al.*, 2005a).

Como puede verse en la **Tabla 2.5**, el perfil de flavanoles de las uvas estuvo conformado principalmente por los monómeros (-)-epicatequina, (+)-catequina y (-)-epicatequin-3-O-galato. Además, se detectaron dos proantocianidinas: dímero de procianidina y dímero de procianidina monogalato. Entre los compuestos detectados en uvas, (-)-epicatequina fue el mayoritario para Syrah y Cabernet Sauvignon, mientras que (-)-epicatequin-3-O-galato lo fue para la variedad Merlot.

El contenido total de flavanoles en los orujos fue significativamente menor en comparación a la respectiva muestra de uva, posiblemente como resultado de su mayor transferencia desde la materia prima hacia el vino durante el proceso de vinificación, a excepción de la variedad Merlot (**Figura 2.2** y **Tabla 2.5**). Una posible explicación para dicho resultado podría ser debido a la presencia de una alta proporción de semillas en el orujo Merlot durante el muestreo. Esta última hipótesis a su vez sustentada por Ivanova *et al.* (2011b), quienes observaron que la uva Merlot de R. Macedonia tuvo un mayor contenido de flavanoles en comparación a la variedad Vranec, siendo este contenido superior almacenado en las semillas.

Desde la fermentación alcohólica al vino elaborado final, el contenido total de flavanoles aumentó significativamente, probablemente como consecuencia de la hidrólisis que

sufren sus precursores poliméricos y sus derivados con ácido gálico, durante la estabilización del vino (**Figura 2.2** y **Tabla 2.5**) (Ginjom *et al.*, 2011). Por ejemplo, el incremento observado en (-)-epicatequina y dímero de procianidina podría ser una consecuencia de la hidrólisis de sus precursores esterificados con ácido gálico, como (-)-epicatequin-3-O-galato y dímero de procianidina monogalato, respectivamente. Además, este resultado es consistente con el incremento estadístico observado en ácido gálico de la fermentación al vino.

2.3.3.4 Ácidos Hidroxicinámicos (AHC)

Como puede observarse en la **Tabla 2.6**, 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.*, 2005a). Ácido caftárico fue el más abundante, seguido por los ácidos coutárico y fertárico, estando este último en niveles relativamente muy bajos en comparación a los AHC identificados (Barcia *et al.*, 2014b). Al igual que con las familias anteriores de compuestos polifenólicos, el contenido total de AHC en los orujos fue significativamente menor en comparación a las respectivas muestras de uva, como resultado de su mayor transferencia desde la materia prima al vino durante la vinificación (**Figura 2.2**). Los AHC cuantificados en uvas, a excepción del ácido fertárico, también se cuantificaron en orujo, fermentación alcohólica y vino. Por otro lado, se sabe que a lo largo de la vinificación los ácidos hidroxicinamoil tartárico sufren hidrólisis debido a las altas temperaturas de fermentación y a la participación de hidrólisis enzimática (Ginjon *et al.*, 2011), por lo tanto, ácido cafeico, derivado de la hidrólisis del AHC más abundante en las uvas, fue observado en fermentaciones alcohólicas y vinos. Luego de su formación, estos ácidos pueden disminuir su contenido como consecuencia de su reacción con los antocianos durante la fermentación y el proceso de envejecimiento (Monagas *et al.*, 2005a). En este sentido, la ausencia de ácido *p*-cumárico podría estar asociada con el incremento de los pigmentos derivados de antocianos, como pigmento A y acetyl pigmento A, sumado al aumentado contenido de los derivados cumaroilglucosilados de delfinidina, petunidina y malvidina que mostraron los orujos. Al igual que en las uvas, ácido caftárico fue el AHC predominante en las fermentaciones alcohólicas y vinos (Ginjom *et al.*, 2011).

2.3.3.5 Ácidos Hidroxibenzoicos (AHB)

De acuerdo a la **Figura 2.2** y a la tabla **Tabla 2.6**, no se detectaron AHB en las uvas, sin embargo se encontró etil galato en los orujos. Desde la fermentación alcohólica al vino

elaborado final, se observó un incremento significativo en el contenido de ácido gálico y etil galato (Borazan & Bozan, 2013; Ginjom *et al.*, 2011; Monagas *et al.*, 2005b). El ácido gálico se extrae de las semillas luego de la hidrólisis de sus ésteres con flavanoles, mediante la acción de esterasas, durante las etapas de maceración y fermentación. La esterificación del ácido gálico con etanol para formar etil galato, ha sido observada durante las etapas de fermentación y envejecimiento (Monagas *et al.*, 2005b), lo que explicaría la presencia de etil galato en los orujos, fermentaciones alcohólicas y vinos, pero no en las uvas.

2.3.3.6 Estilbenos

Los estilbenos constituyen la familia de compuestos polifenólicos no flavonoideos minoritarios en las uvas, y pueden encontrarse en la piel pero no en las semillas (Monagas *et al.*, 2005a). Como puede observarse en la **Tabla 2.6**, solamente *trans*-resveratrol fue detectado en las muestras estudiadas. Este compuesto mostró bajas concentraciones en las uvas, y no fue detectado en los orujos, posiblemente debido a su mayor transferencia al vino (**Figura 2.2**) (Barcia *et al.*, 2014b). Desde la fermentación alcohólica al vino elaborado final, el *trans*-resveratrol no siguió una tendencia común para las tres variedades estudiadas (**Figura 2.2**). En el caso de las variedades Syrah y Merlot, su contenido disminuyó significativamente, de acuerdo con Monagas *et al.*, (2005b). Por el contrario, el contenido de *trans*-resveratrol aumentó significativamente para Cabernet Sauvignon. Estos resultados estarían sugiriendo que el *trans*-resveratrol se extrae de la uva durante la fermentación alcohólica sin embargo, en las etapas posteriores de la vinificación sufre cambios que alteran su contenido. Por ejemplo puede adsorberse a las paredes de las levaduras (Barcia *et al.*, 2014b), isomerizarse (*trans* a *cis*) o puede perder el glucósido por hidrólisis (Monagas *et al.* 2005b). De acuerdo a estos factores, el primero podría estar prevaleciendo en los vinos de la variedad Syrah y Merlot y, por lo tanto, explicando la disminución del contenido de *trans*-resveratrol; mientras que en el caso de la variedad Cabernet Sauvignon, el segundo factor podría estar prevaleciendo sobre el primero.

2.3.4 Caracterización de las variedades en estudio de acuerdo al perfil de polifenoles

La biosíntesis de los polifenoles está estrictamente controlada por los genes de la uva, lo que asegura que el contenido fenólico relativo en un determinado genotipo o variedad sea estable (Mazza 1995; Núñez *et al.*, 2004); mientras que el contenido final de cada uno de los

compuestos puede estar afectado por factores externos como condiciones de cultivo (humedad, temperatura, suelo) y práctica vitivinícola empleada (Liang *et al.*, 2014).

En la sección anterior, se encontró que el contenido y tipo de compuesto polifenólico cambia en cada una de las muestras tomadas a lo largo del proceso de vinificación, pero también se observó que había diferencias entre las variedades estudiadas. Para establecer si este perfil de polifenoles encontrado en cada muestra es capaz de diferenciar las variedades estudiadas, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) considerando las diferencias cuantitativas del perfil polifenólico agrupado por familia de compuestos. En este sentido, los 45 compuestos identificados se agruparon en las diez familias observadas en las **Tablas 2.4, 2.5 y 2.6** de la **Sección 2.3.3**: antocianos glucosilados, acetilglucosilados, cumaroilglucosilados y cafeoilglucosilados, piranoantocianos, flavonoles algicones y glicosilados, flavanoles, AHC, AHB y *trans*-resveratrol.

La **Figura 2.4** muestra los gráficos *biplot* obtenidos del ACP que ilustran la relación entre el perfil polifenólico y las distintas variedades de *Vitis vinifera* L. en las muestras de uvas, orujos, fermentaciones alcohólicas y vinos. Se puede observar que para todas las muestras estudiadas, cerca del 100 % de la variabilidad encontrada en los datos analizados es explicada por la primera y segunda componente principal, CP 1 y CP 2 respectivamente. De acuerdo a CP 1, entre un 58,2 % y 70,2 % de la variabilidad encontrada entre las distintas variedades es explicada por la variabilidad en el perfil polifenólico en cada etapa de la vinificación, siendo en general los compuestos antocianos los que más aportan a la CP 1 y, por lo tanto, más contribuyen a explicar las diferencias entre variedades a lo largo de la vinificación. Asimismo, los *biplots* muestran que en todos los casos las tres variedades estudiadas fueron claramente diferenciadas de acuerdo al perfil polifenólico. En este sentido, la variedad Syrah se caracterizó por el mayor contenido en compuestos antocianos en todas las muestras estudiadas (Ginjom, *et al.*, 2011). En el caso de la variedad Merlot, ésta presentó los valores más altos de *trans*-resveratrol para uvas, fermentaciones alcohólicas y vinos (Atanacković *et al.*, 2012; Stervbo *et al.*, 2007). Por su parte, los compuestos que caracterizaron a la variedad Cabernet Sauvignon dependieron del tipo de muestra analizada. Las uvas se caracterizaron por el mayor contenido en flavonoles, sus orujos por los valores más altos de AHB y piranoantocianos, sus fermentaciones alcohólicas por el mayor contenido en AHB, y finalmente sus vinos se caracterizaron por los valores más altos de AHC y flavanoles.

El ACP demuestra que el perfil de compuestos polifenólicos es dependiente de la variedad en estudio, siendo los antocianos los compuestos más importantes para la diferenciación entre las variedades a lo largo de todo el proceso de vinificación.

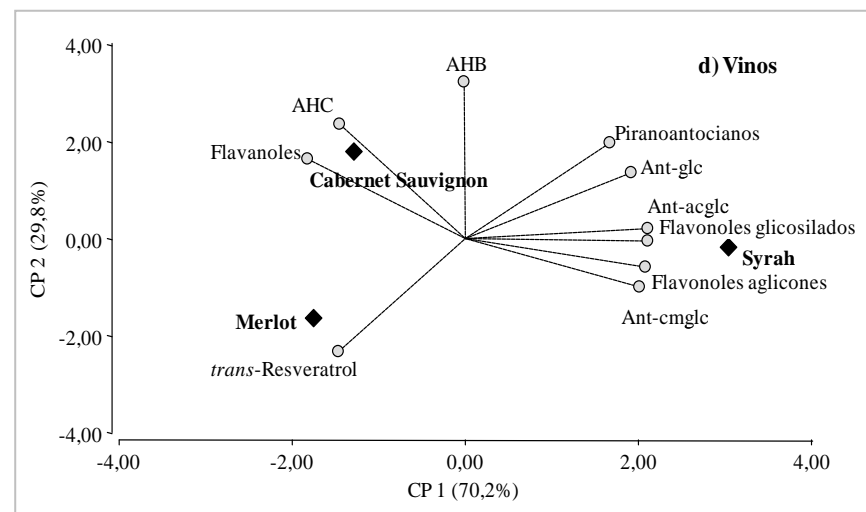
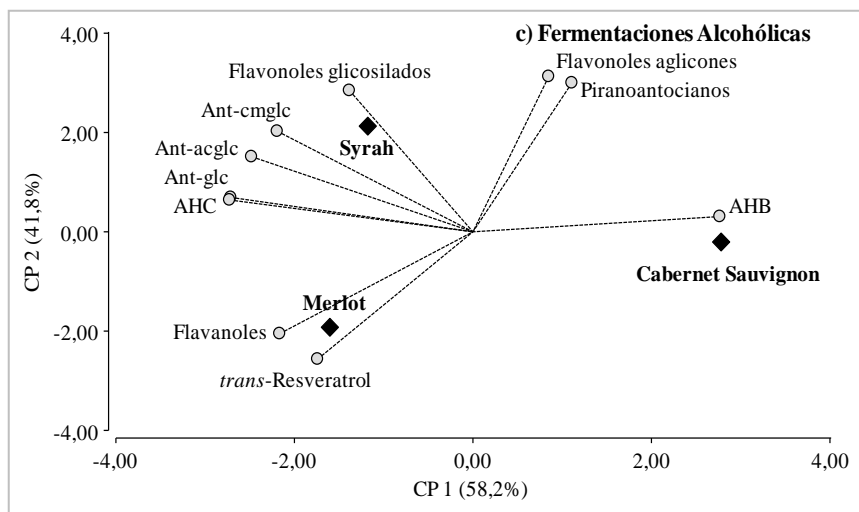
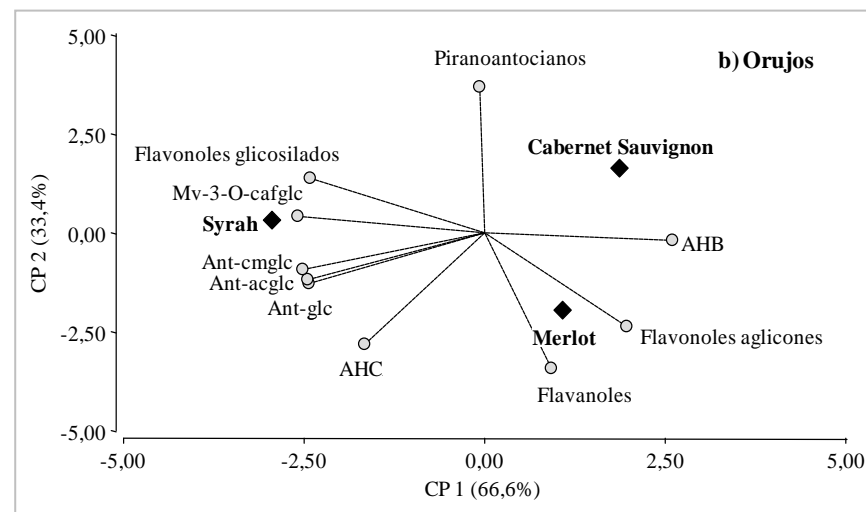
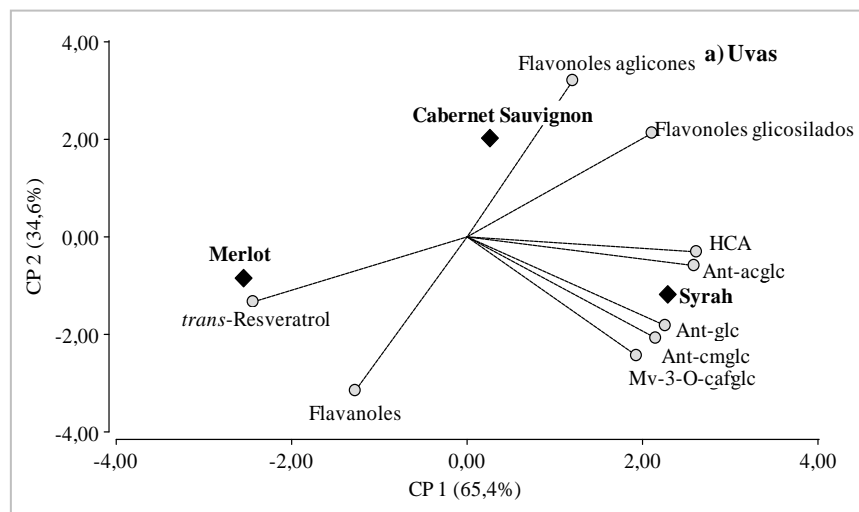


Figura 2.4. Biplots ilustrando la relación entre el perfil polifenólico y las distintas variedades de *Vitis vinifera* L. estudiadas. a) Uvas; b) Orujos; c) Fermentaciones alcohólicas; d) Vinos. Abreviaturas: Ant-glc, Ant-acglc y Ant-cmglc como antocianos glucosilados, acetilglucosilados y cumaroilglucosilados, respectivamente. Mv-3-O-cafglc, malvidina-3-O-cafeoilglucósido; AHC, ácidos hidroxicinámicos; AHB, ácidos hidroxibenzoicos.

2.4 Conclusiones parciales

En esta primera parte de la tesis se estudió el contenido total y el perfil cuali y cuantitativo de compuestos polifenólicos en distintas muestras tomadas a lo largo del proceso de vinificación de tres variedades tintas *V. vinifera* L. cv. Syrah, Merlot y Cabernet Sauvignon producidas en Argentina.

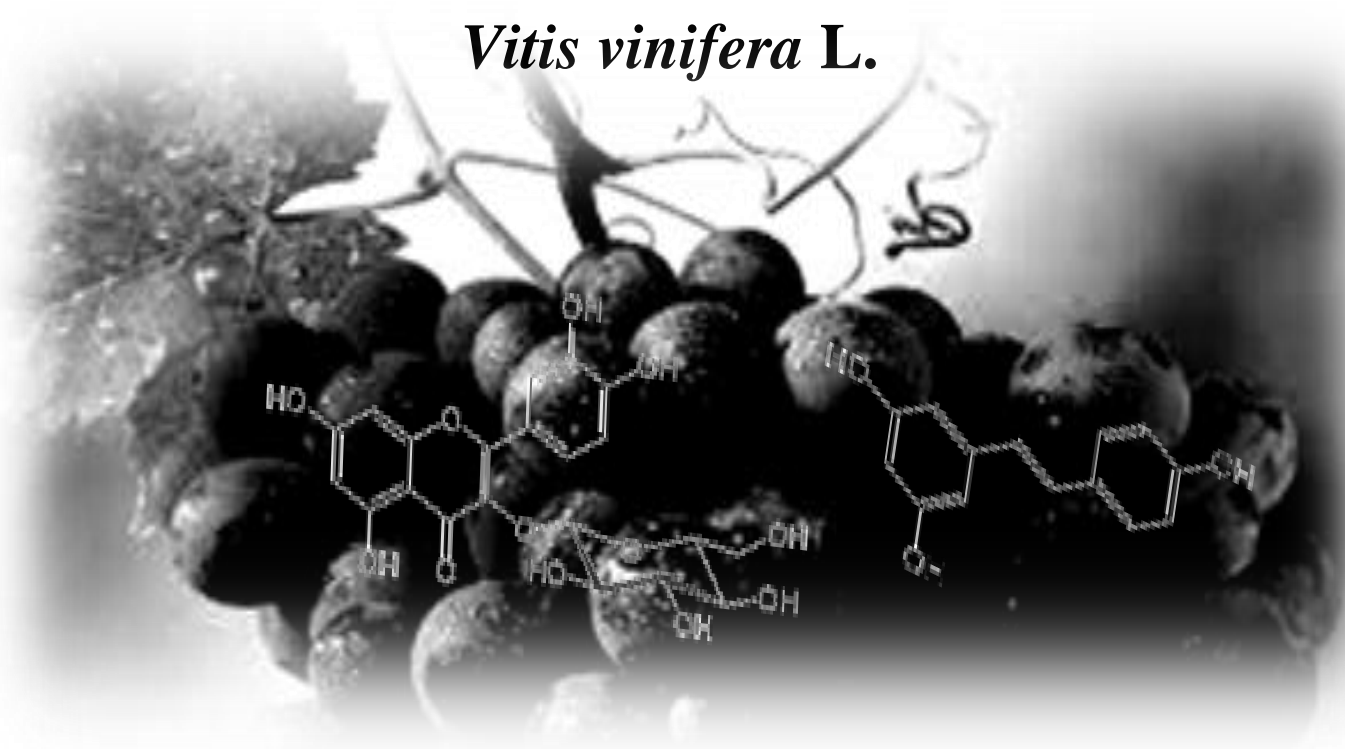
Los resultados obtenidos del estudio del contenido de polifenoles totales (PT) demostraron que ninguna variedad se caracterizó por el mayor contenido de PT a lo largo de la vinificación, sino que éste fue dependiente de la etapa del proceso analizado. Es importante destacar que un alto contenido y gran variedad de compuestos polifenólicos se encontraron remanente en el orujo, constituyendo este residuo agroindustrial una fuente rica, natural y económica de compuestos potencialmente bioactivos.

El análisis del perfil de polifenoles permitió la identificación de un total de 45 compuestos polifenólicos en las muestras estudiadas. La medición de cada uno de éstos en las distintas etapas del proceso de vinificación demostró que se producen importantes cambios cuali y cuantitativos en el perfil desde la materia prima hasta la obtención del producto final. Los principales cambios observados fueron hidrólisis de flavonoles glicosilados, de ácidos hidroxycinamoil tartáricos, y de ésteres del ácido gálico con flavanoles; también se observó la formación de pigmentos derivados de antocianos.

Por otro lado, se observaron importantes diferencias cuantitativas entre las variedades estudiadas, poniendo de manifiesto la influencia del genotipo en la determinación del perfil polifenólico que lo compone. En este sentido, la variedad Syrah se caracterizó por el mayor contenido en compuestos antocianos; Merlot se destacó por su mayor contenido en *trans*-resveratrol; mientras que el perfil característico de Cabernet Sauvignon fue determinado por la etapa del proceso de vinificación analizada.

CAPÍTULO 3
EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE *IN VITRO* A LO
LARGO DE LA VINIFICACIÓN DE
TRES VARIEDADES TINTAS

Vitis vinifera L.



3.1 Antecedentes

El poder antioxidante de los polifenoles ha sido atribuido principalmente a sus propiedades redox, las cuales les permiten actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno, captadores de radicales libres y/o quelantes de metales, interfiriendo de este modo en la propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres y evitando así la oxidación de los componentes celulares (Huang *et al.*, 2005).

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).

La capacidad antioxidante de un alimento o muestra es el resultado de los efectos sinérgicos y/o antagónicos de la interacción de los distintos compuestos polifenólicos entre sí y con otros componentes de la matriz alimentaria o del organismo como proteínas, carbohidratos y lípidos (Jakobek, 2015). En la bibliografía pueden encontrarse muchos estudios sobre la capacidad antioxidante de uvas, orujos y vinos. Sin embargo son pocos los trabajos que buscan explicar dicha bioactividad en base al perfil de polifenoles. Algunos trabajos describen la correlación entre los diferentes compuestos polifenólicos y la capacidad antioxidante a lo largo de la vinificación (Burns *et al.*, 2001; Ginjom *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011); no obstante, estos estudios utilizan métodos estadísticos de correlación simple para

determinar dicha relación. Dichos métodos estadísticos no proporcionan información sobre la contribución relativa de cada uno de estos compuestos a la capacidad antioxidante. En este sentido, el uso de un método estadístico multivariado, como el análisis de regresión múltiple (ARM), para el estudio de la correlación entre los cambios en el perfil polifenólico y la actividad antioxidante, permitiría evaluar la contribución relativa de cada uno de estos compuestos y, de esta manera, identificar aquellos que son claves para explicar la capacidad antioxidante observada.

Esta segunda parte de la tesis estudia la capacidad antioxidante mediante los ensayos FRAP, ABTS y DPPH, de las muestras tomadas a lo largo del proceso de vinificación de tres variedades tintas *V. vinifera* L. cv. Syrah, Merlot y Cabernet Sauvignon cultivadas en Argentina. Mediante ARM, como técnica estadística de análisis multivariado, se investiga la relación entre la capacidad antioxidante observada con el perfil polifenólico encontrado en cada etapa de manera de identificar los compuestos más importantes para explicar la bioactividad de las muestras.

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Estándares y Reactivos

Para la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* se utilizó ABTS (sal diamónica del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)), DPPH (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), TPTZ (2,4,6-tripiridil-S-triazina), y Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico) (Sigma Aldrich, Suiza). El persulfato de potasio fue obtenido de Fluka (Dorset, U.K.) y el Cloruro férrico hexahidratado de Carlo-Erba. Se utilizó metanol anhidro (Sintorgan, Argentina). El agua utilizada para las determinaciones fue ultra pura (< 5 µg/ L TOC y conductividad de 0,055 µS/ cm), obtenida de un sistema de purificación Arium 61316-RO acoplado a un sistema Arium 611-UV (Sartorius, Alemania).

3.2.2 Muestras de estudio

Las muestras utilizadas en este estudio fueron las mismas que las empleadas para el estudio de compuestos polifenólicos (Sección 2.2.3, CAPÍTULO 2).

3.2.3 Determinación de la 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.

3.2.3.1 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 (**Figura 3.1**). 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.

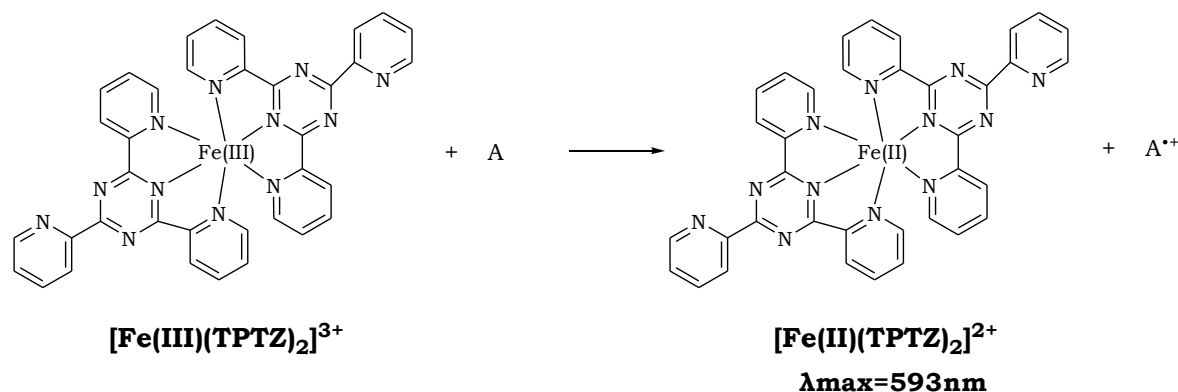


Figura 3.1. Reacción del ensayo FRAP. A es un compuesto antioxidante.

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 300mM ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ a pH = 3,6), TPTZ 10 mM en HCl 40 mM y tricloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 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 μL 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 triplicado y se calculó la absorbancia de cada muestra a través de la diferencia (ΔAbs) de $A_1 - A_0$.

El poder reductor 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 y orujo se expresaron como milimoles equivalentes de trolox por 100 g de peso seco de muestra (mmol ET/ 100 g). En el caso de las fermentaciones alcohólicas y los vinos, los resultados se informaron como milimoles equivalentes de trolox en 1 L de muestra (mmol ET/ L).

3.2.3.2 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^{•+}), convirtiéndolo a un producto sin color (**Figura 3.2**) (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^{•+} es linealmente dependiente de la concentración de antioxidantes presentes en la muestra (Prior *et al.*, 2005).

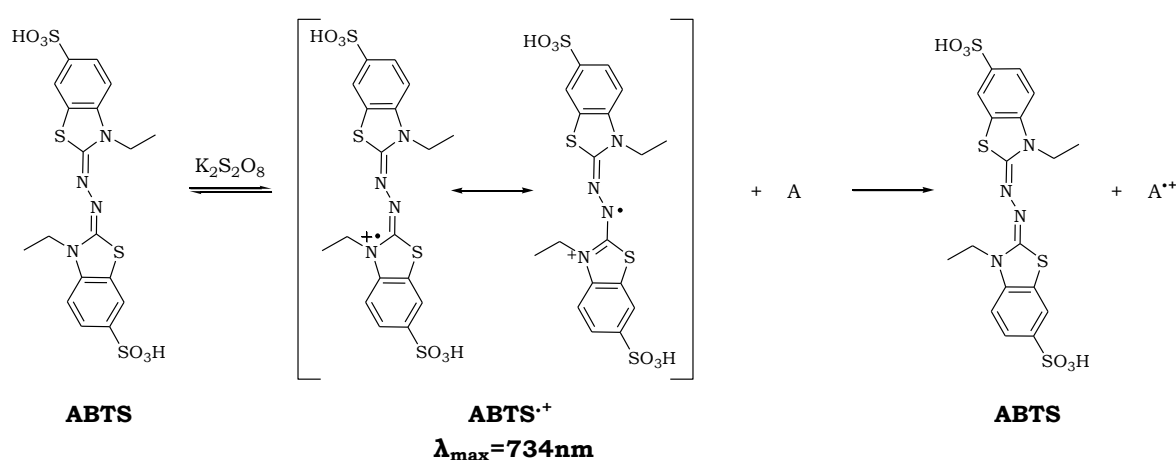


Figura 3.2. Reacción del ensayo ABTS. A es un compuesto antioxidante.

Procedimiento. La metodología utilizada en este trabajo es una variante del método original, propuesta por Re *et al.* (1999), en la que el ABTS^{•+} se genera directamente a través de la reacción con persulfato de potasio (K₂S₂O₈).

El ABTS^{•+} se preparó diariamente mezclando 10 mL de una solución de ABTS 7 mM en agua ultra pura, con 6,7 mg de K₂S₂O₈. 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 (A₁) 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 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 y orujo se expresaron como milimoles equivalentes de trolox en 100 g de peso seco de muestra (mmol ET/ 100 g). En el caso de las fermentaciones alcohólicas y los vinos, los resultados se informaron como milimoles equivalentes de trolox en 1 L de muestra (mmol ET/ L).

3.2.3.3 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 \cdot), convirtiéndolo a un producto sin color (**Figura 3.3**) (Brand-Williams *et al.*, 1995). El DPPH \cdot 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 \cdot es directamente proporcional a la concentración de antioxidantes presentes en la muestra (Prior *et al.*, 2005).

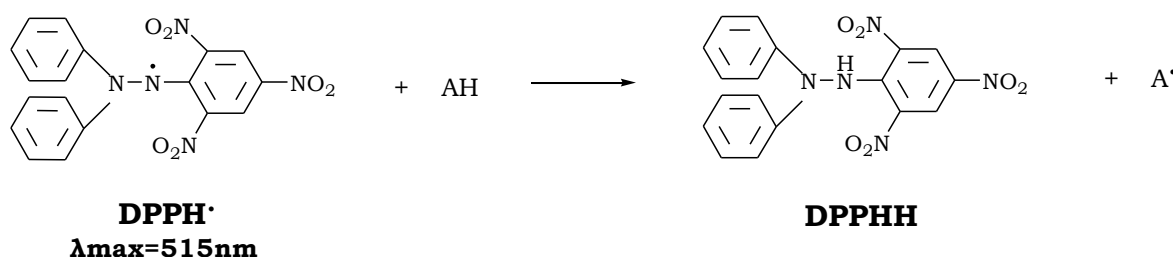


Figura 3.3. Reacción del ensayo DPPH. AH es un compuesto antioxidante.

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 y orujo se expresaron como milimoles equivalentes de trolox en 100 g de peso seco de muestra (mmol ET/ 100 g). En el caso de las fermentaciones alcohólicas y los vinos, los resultados se informaron como milimoles equivalentes de trolox en 1 L de muestra (mmol ET/ L).

3.2.4 Análisis Estadísticos de los datos

El análisis estadístico de los datos generados en este capítulo de la tesis se realizó mediante la utilización de los programas InfoStat (versión 2014p) y STATISTICA (versión 7.1).

3.2.4.1 Estadística Descriptiva

De acuerdo a la **Sección 2.2.5.1** del **CAPÍTULO 2**, los valores obtenidos en las diferentes determinaciones analíticas de este capítulo son expresados como la media \pm desviación estándar.

3.2.4.2 Estadística Inductiva- Análisis de la Varianza (ANOVA)

De acuerdo a la **Sección 2.2.5.2** del **CAPÍTULO 2**, el ANOVA se aplicó a los valores obtenidos en las determinaciones analíticas 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.

3.2.4.3 Estadística Multivariada

3.2.4.3.1 Análisis de correlación simple de Pearson (ACSP)

El ACSP se realiza con el fin de obtener una medida de la magnitud y el tipo de asociación lineal entre dos variables. Coeficientes de correlación próximos a la unidad y positivos señalan un comportamiento similar entre las variables; por el contrario, si el coeficiente es negativo y próximo a la unidad indica un comportamiento opuesto entre dichas variables.

El ACSP se aplicó para estudiar la relación entre el contenido de polifenoles totales (PT) y la CA *in vitro*, media por los ensayos FRAP, ABTS y DPPH en cada tipo de muestra (uva, orujo, fermentación alcohólica y vino).

3.2.4.3.2 Análisis de Correlación Canónica (ACC)

Es una técnica que permite hacer un estudio cuantitativo de los datos debido a que permite determinar la relación lineal entre dos grupos de variables métricas, un grupo de variables independientes y otro grupo de variables dependientes. Este análisis provee una medida de correlación (L o correlación canónica) entre una combinación lineal de las variables en un conjunto (l_X o variable canónica de X), con una combinación lineal de las variables en el otro conjunto (l_Y o variable canónica de Y). En un primer paso el análisis determina el par de combinaciones lineales con máxima correlación. En un segundo paso, identifica el par con máxima correlación entre todos los pares no correlacionados con el par de combinaciones seleccionadas en el primer paso y así sucesivamente.

El ACC se utilizó para evaluar la relación entre el perfil fenólico (agrupado por familias de compuestos) y la CA medida por los ensayos *in vitro* (FRAP, ABTS y DPPH) en cada tipo de muestra.

3.2.4.3.3 Análisis de Regresión Múltiple paso a paso (ARM *stepwise*)

Es una técnica que permite hacer un estudio cuantitativo de los datos por medio de un modelo de regresión lineal, permitiendo estudiar (explicar o predecir) la relación funcional entre una variable respuesta Y (variable dependiente) y dos o más variables regresoras X (variables independientes o predictoras). Mediante la regresión se estudia cómo los cambios en las variables predictoras afectan a la variable respuesta, por medio del ajuste de un modelo para la relación funcional entre ambas. Genéricamente, esta relación se modela de la forma: $Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n$. Los coeficientes $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_n$ permiten estudiar la relación entre los dos tipos de variables, ya que el signo y la magnitud de cada uno determina la dirección y la intensidad o importancia, respectivamente, relativa de cada variable independiente sobre la variable dependiente. El ARM en el modo paso a paso (*stepwise*) selecciona las variables regresoras a incluir o eliminar del modelo de regresión de acuerdo a los valores respectivos del estadístico F. El valor F de cada variable regresora indica su significancia estadística en la explicación de la variable respuesta. En esta tesis, se seleccionaron las variables cuyos valores de F fueron mayores a 3.

El ARM además de brindar evidencia adicional sobre la relación entre el perfil fenólico y la CA medida por FRAP, ABTS y DPPH, se aplicó para estudiar mediante el análisis de los coeficientes de regresión Beta (β) la importancia de las variables predictoras, es decir aquellos compuestos polifenólicos que explicarían de mejor manera la CA observada en las muestras.

3.3 Descripción de los resultados y discusión

Teniendo en cuenta los diferentes mecanismos de acción por los cuales los polifenoles podrían estar ejerciendo su acción, la capacidad antioxidante (CA) de las muestras se midió por diferentes métodos (Moon & Shibamoto, 2009). En este sentido, la CA *in vitro* se midió mediante los ensayos FRAP, que mide el poder reductor, y ABTS y DPPH, donde ambos miden la capacidad de captación de radicales libres. A continuación se muestran los resultados obtenidos de la capacidad antioxidante (CA) *in vitro* a lo largo de la vinificación de *V. vinifera* L. cv. Syrah, Merlot y Cabernet Sauvignon. Los vinos y las fermentaciones se analizaron sin tratamiento previo, mientras que para uvas y orujos, la CA se determinó sobre sus extractos polifenólicos.

3.3.1 Capacidad Antioxidante

La **Figura 3.4** muestra los resultados obtenidos de la capacidad antioxidante (CA) *in vitro* medida por los ensayos FRAP, ABTS y DPPH. A lo largo de la vinificación, se observó una tendencia similar para los tres ensayos empleados. En este sentido, entre las muestras de uva, la variedad Cabernet Sauvignon mostró la mayor CA, mientras que Syrah mostró los valores más bajos. En el caso de los orujos las variedades Merlot y Syrah fueron las que demostraron la mayor CA. El análisis de las fermentaciones alcohólicas no mostró diferencias entre variedades; mientras que en el caso de los vinos las variedades Syrah y Merlot fueron las que presentaron mayor CA.

Al comparar entre matrices, se observó que la CA de los orujos Merlot y Syrah fue significativamente ($p < 0,001$) mayor que la de sus respectivas materias primas, mientras que el orujo Cabernet Sauvignon presentó una CA menor a la de su respectiva uva ($p < 0,0001$). Desde la fermentación alcohólica hasta la obtención del producto final se observó que dicha actividad fue estable o levemente incrementada en concordancia con lo publicado por Sun *et al.* (2011). De acuerdo a estos resultados, ninguna variedad se destacó por presentar la mayor CA en todas las muestras estudiadas a lo largo de la vinificación, sino que ésta fue dependiente de la etapa del proceso analizada.

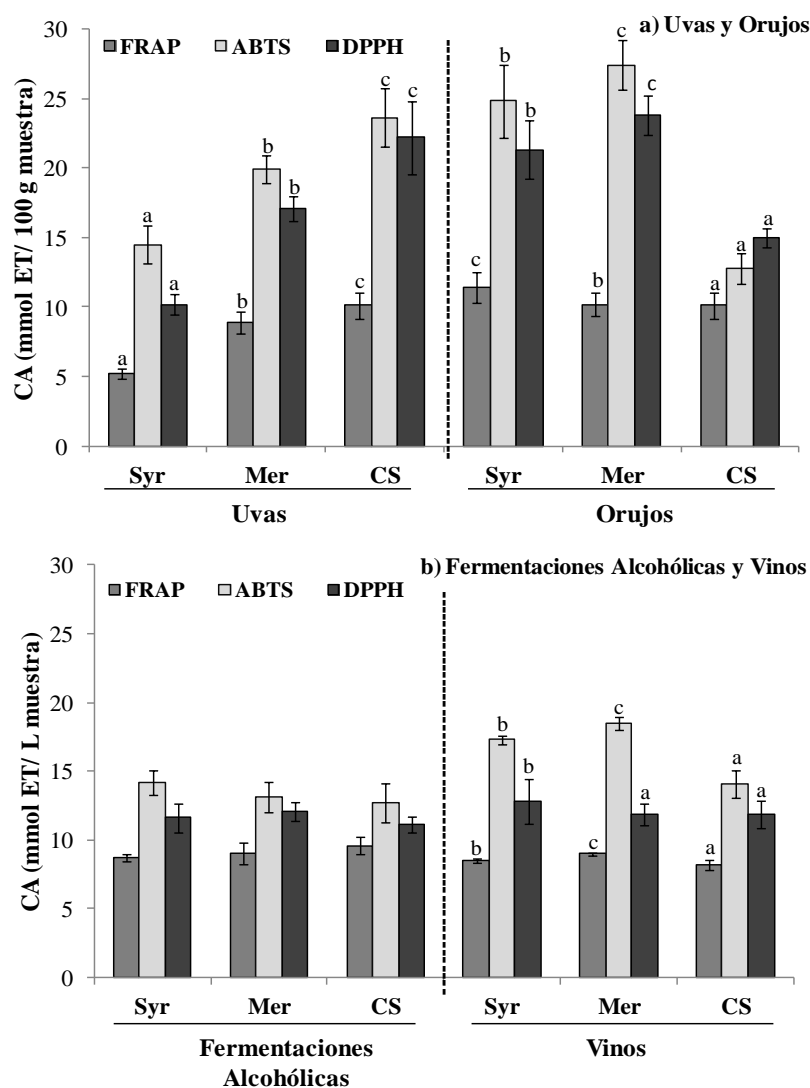


Figura 3.4. Capacidad Antioxidante (CA) evaluada por los métodos FRAP, ABTS y DPPH en muestras tomadas a lo largo de la vinificación de tres variedades tintas *V. vinifera* L. a) Uvas y Orujos; b) Fermentaciones Alcohólicas y Vinos. CA expresada como: mmol ET/ 100 g peso seco para uvas y orujos; mmol ET/ L para fermentaciones alcohólicas y vinos. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre variedades. Abreviaturas: Syr, Syrah; Mer, Merlot; CS, Cabernet Sauvignon.

Los resultados obtenidos para la CA de las uvas evaluada mediante los ensayos ABTS (valor promedio entre variedades: 19,3 mmol ET/ 100 g) y DPPH (valor promedio entre variedades: 16,5 mmol ET/ 100 g) fueron mayores a los informados por Panceri *et al.* (2013), quienes encontraron valores de 0,2 y 0,3 mmol ET/ 100 g respectivamente, para diferentes variedades de uvas de vinificar *V. vinifera* L. cultivadas en Brasil. Por otro lado, los valores de ABTS (valor promedio entre variedades: 21,7 mmol ET/ 100 g) obtenidos para los orujos estuvieron en línea con los descriptos por Pérez-Jiménez *et al.* (2008) quienes informaron valores de 12,4 mmol ET/ 100 g para orujos tintos *V. vinifera* producidos en Manzanares, España. Sin embargo, los valores que encontraron para FRAP (24,4 mmol ET/ 100 g) fueron mayores a los obtenidos en este estudio (valor promedio entre variedades: 9,6 mmol ET/ 100

g). Más tarde Rockenbach *et al.* (2011) estudiaron la CA de diferentes variedades de orujos tintos *V. vinifera* L. y *V. labrusca* L. producidos en Brasil, encontrando amplios intervalos para los valores de FRAP (entre 11,8 y 24,9 mmol / 100 g), ABTS (entre 19,3 y 48,5 mmol / 100 g) y DPPH (entre 18,8 y 50,5 mmol / 100 g) dentro de los cuales se encontraron los resultados obtenidos en este estudio (valor promedio entre variedades para DPPH: 20,0 mmol ET/ 100 g). En cuanto a la CA de los vinos, los valores de FRAP (entre 8,2 y 9,0 mmol ET/ L) fueron concordantes con los publicados por Baroni *et al.* (2012) (entre 6,8 y 16,6 mmol ET/ L) para diferentes variedades de vinos tintos producidos en Argentina, mientras que los valores que informaron para ABTS (entre 1,8 y 2,1 mmol ET/ L) estuvieron por debajo de los obtenidos en este estudio (entre 14,1 y 18,5 mmol ET/ L). Tauchen *et al.* (2015) publicaron valores de DPPH (entre 9,5 y 19,3 mmol ET/ L) de diferentes vinos tintos varietales europeos que estuvieron en concordancia con los obtenidos en este estudio (entre 11,9 y 12,8 mmol ET/ L). 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.

FRAP, ABTS y DPPH son los métodos más ampliamente utilizados para el estudio de la CA *in vitro* de antioxidantes naturales. Desde el punto de vista del mecanismo de reacción, los ensayos ABTS y DPPH evalúan el poder de captar radicales de un compuesto a través de reacciones basadas en los mecanismos SET (transferencia de un electrón) y HAT (transferencia de un átomo de hidrógeno) dependiendo del antioxidante evaluado (Foti *et al.*, 2004; Prior *et al.*, 2005). Por el contrario, la reacción del ensayo FRAP, que evalúa el poder reductor de un compuesto, sigue un mecanismo basado en SET (Prior *et al.*, 2005). Por lo tanto, 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).

3.3.2 Correlación entre Capacidad Antioxidante y contenido de compuestos polifenólicos

Teniendo en cuenta las diferencias observadas en la CA, como así también en la composición polifenólica de las muestras (**Sección 2.3.3, CAPÍTULO 2**), se evaluó la

relación entre ambos parámetros con el fin de poder explicar las diferencias observadas en la CA.

En primer lugar, se evaluó la relación entre la CA y su contenido en PT mediante análisis de correlación simple. Para las muestras de uvas, se observó una correlación positiva ($r > 0,84$; $p < 0,001$) entre la CA, determinada por FRAP, ABTS y DPPH, y su contenido en PT. En el caso de las muestras de orujo, los valores de ABTS y DPPH se asociaron positivamente ($r > 0,64$; $p < 0,001$) con el contenido de PT, mientras que los valores de FRAP no mostraron relación alguna. Las fermentaciones alcohólicas no mostraron asociación entre la CA y el contenido de PT, mientras que los valores de FRAP y ABTS de los vinos correlacionaron positivamente ($r > 0,68$; $p < 0,001$) con el contenido de PT, aunque no así los valores de DPPH.

La falta de correlación entre ensayos de CA *in vitro* y el contenido de PT en este tipo de muestras también han sido observado por otros autores (Baroni *et al.*, 2012; Ginjom *et al.*, 2010; Stefenon *et al.*, 2010). Se sabe que de acuerdo a la naturaleza química de los compuestos polifenólicos, es el mecanismo (poder reductor o poder de captación de radicales libres, en el caso de este estudio) por el cual ejercen su efecto antioxidante (Ginjom *et al.*, 2011). Además, se ha demostrado que no solo su estructura química, sino también la cantidad de cada tipo de compuesto polifenólico presente en una muestra, son los factores que determinan la CA y no así el contenido de PT (Ruberto *et al.*, 2007). Por lo tanto, para evaluar la asociación entre la CA y el perfil de polifenoles es necesario utilizar técnicas de estadística multivariada, como el análisis de correlación canónica (ACC) y el análisis de regresión múltiple (ARM).

El ACC entre la CA (FRAP, ABTS y DPPH) y las familias de compuestos polifenólicos (de acuerdo a la **Sección 2.3.4, CAPÍTULO 2**) mostró una correlación significativa ($r > 0,97$; $p < 0,01$) para todas las muestras estudiadas (uvas, orujos, fermentaciones alcohólicas y vinos). Esto estaría indicando que hay una asociación entre el perfil de polifenoles y la CA, lo cual podría ayudar a explicar las diferencias de actividad observada entre las muestras. En este sentido y con el fin de identificar específicamente los compuestos más importantes para explicar la CA de las muestras, se realizó un ARM. Este análisis mostró nuevamente una correlación significativa entre la actividad y el perfil polifenólico (FRAP: $r > 0,54$, $p < 0,05$; ABTS: $r > 0,58$, $p < 0,05$; DPPH: $r > 0,40$, $p < 0,05$) para todas las muestras. Mediante el análisis de los valores de los coeficientes beta (β) para

cada compuesto, se identificaron aquellos más importantes para la CA. En la **Figura 3.5** se muestra la magnitud y el tipo de contribución (β) de los compuestos con la mayor contribución a la CA de las muestras. En la **Figura 3.6** se ilustra la asociación entre el contenido de dichos compuestos y las tres variedades en estudio.

El estudio de la contribución de cada polifenol (variable predictora) al modelo de regresión (**Sección 3.2.4.3.3**) mostró que de los 39 compuestos cuantificados en las uvas, 26 fueron seleccionados para explicar la CA determinada por FRAP, 25 para ABTS y 28 para DPPH. El análisis de la magnitud de los β mostró a los mismos compuestos como los más importantes para explicar la CA determinada por los tres ensayos. Astilbina y dímero de procianidina fueron los que demostraron la mayor contribución positiva a la CA, mientras que peonidina-3-O-cumaroilglucósido, (-)-epicatequina y miricetina demostraron la mayor contribución negativa (**Figura 3.5a**). Al comparar el contenido de estos compuestos entre las variedades estudiadas (**Figura 3.6a**; **Tablas 2.4 y 2.5, CAPÍTULO 2**), se observó que astilbina y dímero de procianidina se encontraron en mayor concentración en Cabernet Sauvignon, mientras que peonidina-3-O-cumaroilglucósido, (-)-epicatequina y miricetina mostraron el contenido más alto en la variedad Syrah. Estas diferencias cuantitativas en estos compuestos polifenólicos permitirían explicar la CA más alta y más baja para las uvas de las variedades Cabernet Sauvignon y Syrah, respectivamente (**Figura 3.4a**).

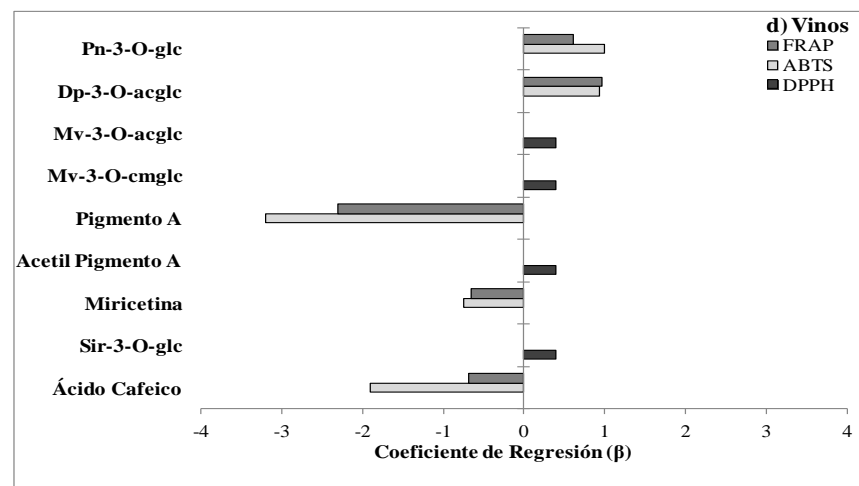
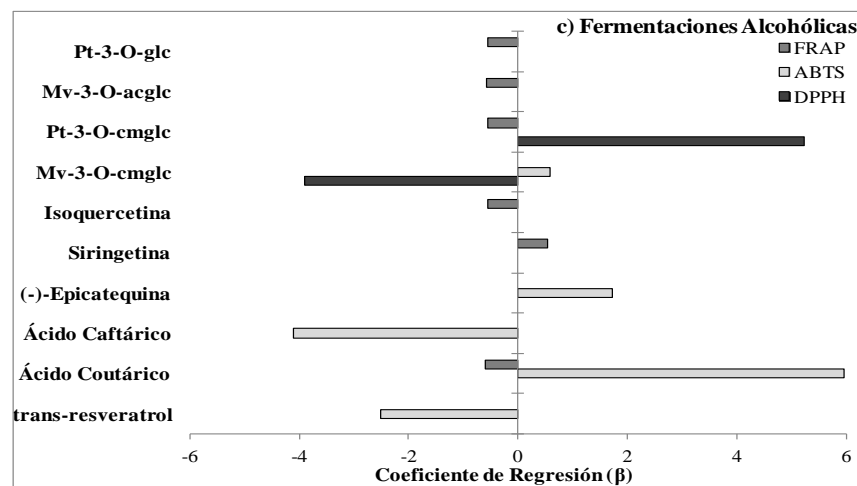
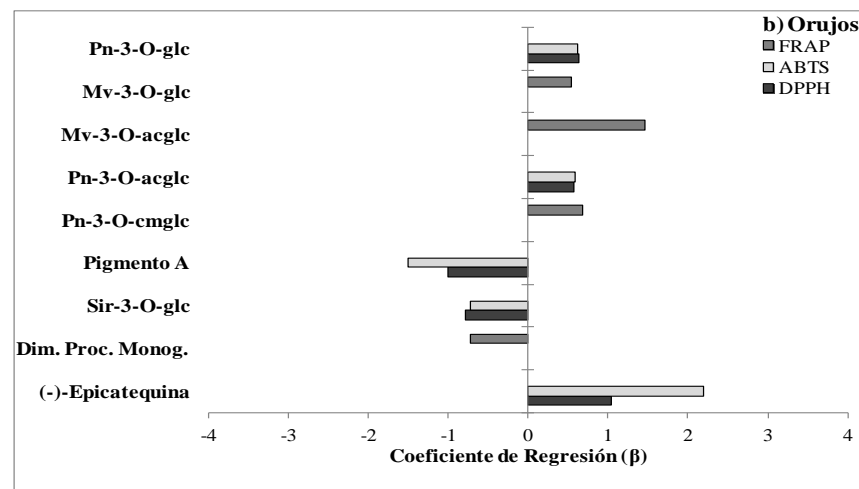
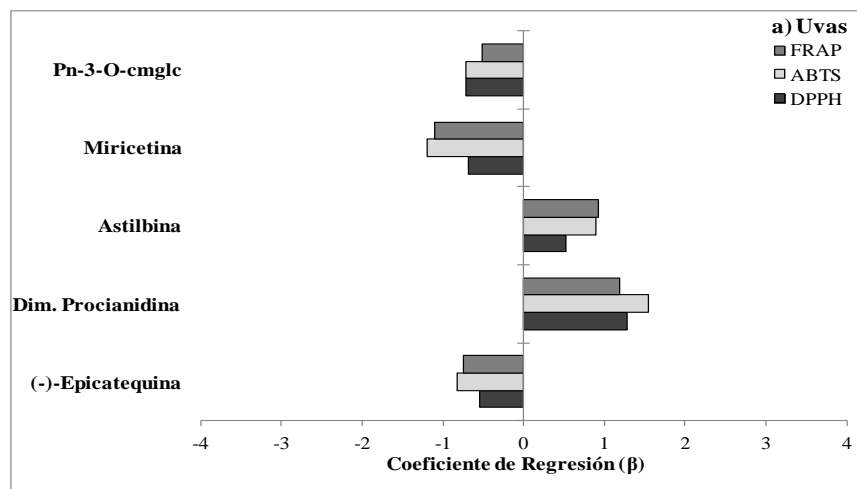


Figura 3.5. Contribución (dada por los Coeficientes β) de los compuestos más importantes para explicar la CA *in vitro* de muestras tomadas a lo largo de la vinificación de tres variedades tintas *V. vinifera* L. a) Uvas; b) Orujos; c) Fermentaciones Alcohólicas; d) Vinos. Abreviaturas: Mv, malvidina; Pn, peonidina; Pt, petunidina; glc, glucósido; ac, acetil; cm, cumaroil; Sir, siringetina; Dim. Procianidina, dímero de procianidina; Dim. Proc. Mong., dímero de procianidina monogalato.

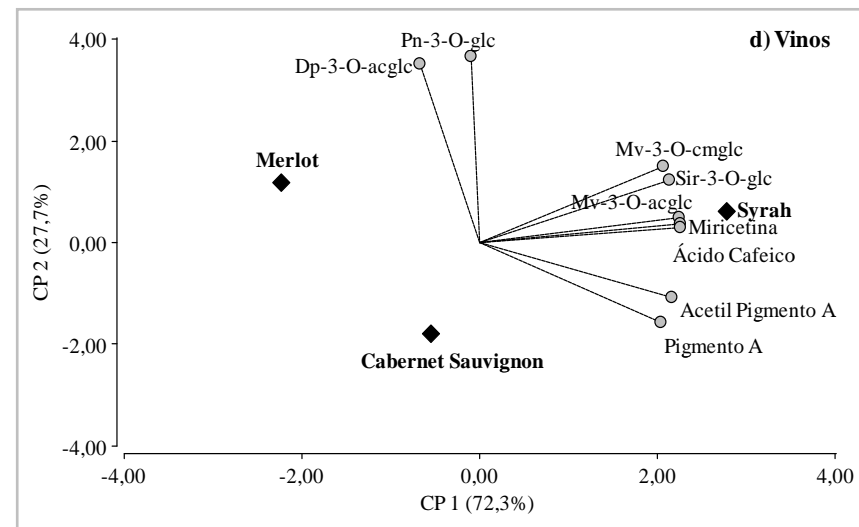
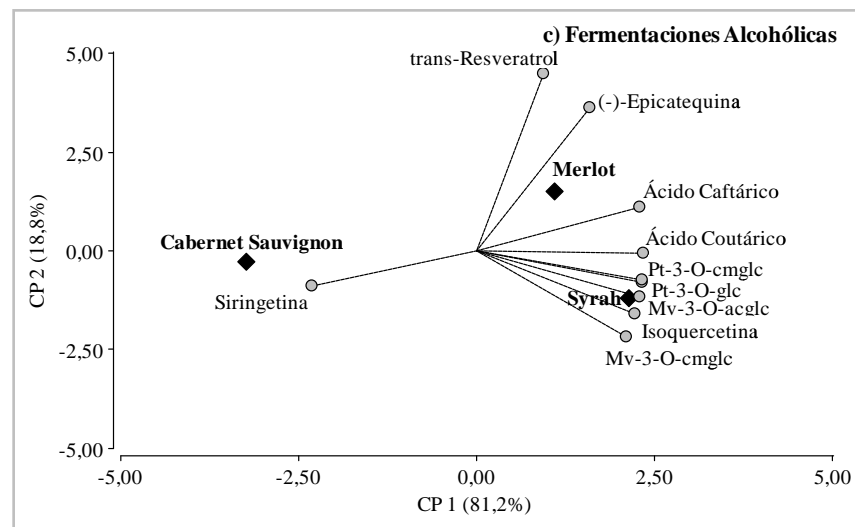
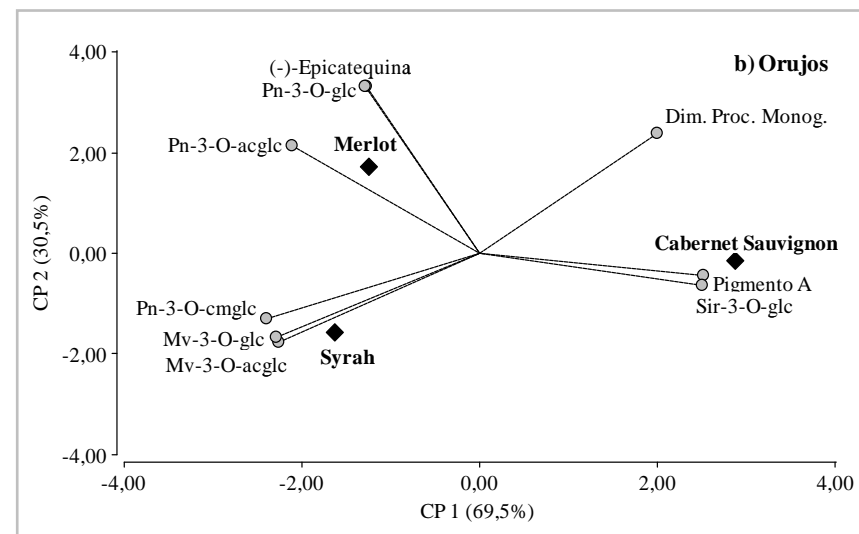
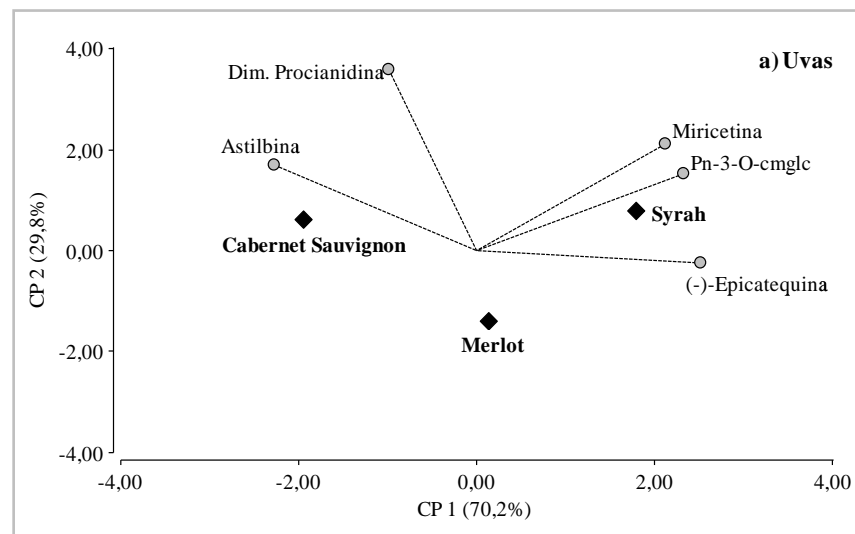


Figura 3.6. Biplots ilustrando la relación entre los compuestos más importantes para explicar la CA *in vitro* y las tres variedades tintas *V. vinifera* L. a) Uvas; b) Orujos; c) Fermentaciones Alcohólicas; d) Vinos. Abreviaturas: Mv, malvidina; Pn, peonidina; Pt, petunidina; glc, glucósido; ac, acetil; cm, cumaroil; Sir, siringetina; Dim. Procianidina, dímero de procianidina; Dim. Proc. Mong., dímero de procianidina monogalato.

En el caso de los orujos, se observaron diferencias en los compuestos que más contribuyeron a los diferentes ensayos. El ARM seleccionó 23 de los 36 polifenoles cuantificados para explicar la CA determinada por FRAP, de los cuales malvidina-3-O-glucósido, malvidina-3-O-acetilglucósido, y peonidina-3-O-cumaroilglucósido presentaron la mayor contribución positiva, mientras que dímero de procianidina monogalato demostró la mayor contribución negativa a este valor (**Figura 3.5b**). En el caso de los ensayos ABTS y DPPH, de los 28 y 24 compuestos respectivamente, seleccionados por el ARM, peonidina-3-O-glucósido, peonidina-3-O-acetilglucósido y (-)-epicatequina demostraron la mayor contribución positiva a sus valores, mientras que pigmento A y siringetina-3-O-glucósido demostraron la mayor contribución negativa (**Figura 3.5b**). Nuevamente, al comparar el contenido de estos compuestos entre las variedades estudiadas (**Figura 3.6b; Tablas 2.4 y 2.5, CAPÍTULO 2**), se observó que el contenido de aquellos que contribuyeron positivamente a los ensayos de CA, se encontraron en mayor concentración en las variedades Syrah y Merlot respecto de Cabernet Sauvignon. Por el contrario, los compuestos que contribuyeron negativamente se encontraron en concentraciones más altas en Cabernet Sauvignon. Estas diferencias cuantitativas entre los perfiles polifenólicos permitirían explicar la mayor actividad de los orujos Syrah y Merlot respecto a Cabernet Sauvignon (**Figura 3.4a**).

Para las fermentaciones alcohólicas, también se observaron diferencias en los compuestos con la mayor contribución a los ensayos de CA. El análisis seleccionó 6 de los 36 compuestos cuantificados en estas muestras para explicar la CA determinada por FRAP. Petunidina-3-O-glucósido, malvidina-3-O-acetilglucósido, petunidina-3-O-cumaroilglucósido, isoquercetina y ácido coutárico contribuyeron negativamente al FRAP, mientras que siringetina contribuyó positivamente. En el caso del ABTS, 7 compuestos fueron seleccionados por el ARM, donde malvidina-3-O-cumaroilglucósido, (-)-epicatequina y ácido coutárico aportaron positivamente, mientras que ácido caftárico y *trans*-resveratrol lo hicieron negativamente. Para el DPPH, de los 3 compuestos seleccionados petunidina-3-O-cumaroilglucósido mostró el mayor aporte positivo, mientras que malvidina-3-cumaroilglucósido lo hizo de manera negativa (**Figura 3.5c**). A pesar de las diferencias cuantitativas en estos compuestos entre variedades (**Figura 3.6c; Tablas 2.4, 2.5 y 2.6, CAPÍTULO 2**) no se observaron diferencias entre sus CA (**Figura 3.4b**) lo que estaría indicando que la sumatoria de las actividades de cada compuesto sería la misma para las tres variedades.

Finalmente en los vinos, de los 33 polifenoles cuantificados, 18 y 23 fueron seleccionados por el ARM para explicar la CA determinada por FRAP y ABTS, respectivamente. Los compuestos con mayor contribución fueron los mismos para ambos ensayos. Peonidina-3-O-glucósido y delphinidina-3-O-acetilglucósido contribuyeron positivamente, mientras que pigmento A, miricetina y ácido cafeico lo hicieron negativamente (**Figura 3.5d**). Para el ensayo de DPPH, de los 11 polifenoles seleccionados por el ARM, malvidina-3-O-acetilglucósido, malvidina-3-O-cumaroilglucósido, acetil pigmento A y siringetina-3-O-glucósido demostraron la mayor contribución positiva (**Figura 3.5d**). Cuando comparamos el contenido de estos compuestos entre las variedades estudiadas (**Figura 3.6d; Tablas 2.4, 2.5 y 2.6, CAPÍTULO 2**), se observó que la variedad Merlot presentó el contenido más alto de peonidina-3-O-glucósido y delphinidina-3-O-acetilglucósido, mientras que presentó el contenido más bajo de pigmento A, miricetina y ácido cafeico; estos cambios cuantitativos del perfil explicarían los mayores valores de FRAP y ABTS observados para esta variedad (**Figura 3.4b**). De la misma manera, se observó que el contenido de los compuestos que contribuyeron positivamente al DPPH, se encontraron en mayor concentración en la variedad Syrah, permitiendo explicar el mayor valor de DPPH demostrado por esta variedad (**Figura 3.4b**).

Los resultados hasta aquí obtenidos demuestran que la CA observada en cada etapa de la vinificación, depende del tipo y cantidad de compuesto polifenólico presente en la muestra, siendo estos dos factores los que finalmente influyen en las diferentes propiedades antioxidantes de la variedad. La CA de la materia prima del proceso se debió principalmente a la contribución de dímero de procianidina, mientras que compuestos específicos pertenecientes a la familia de los antocianos fueron los más importantes para explicar la CA del vino. En el caso de los orujos, nuevamente compuestos específicos pertenecientes a la familia de los antocianos junto con (-)-epicatequina se señalaron como importantes para su capacidad antioxidante. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores (Arnous *et al.*, 2001; Fernández-Pachón *et al.*, 2004; Ginjom *et al.*, 2011; Rivero-Pérez *et al.*, 2008; Ruberto *et al.*, 2007), quienes señalaron a los flavanoles totales y/o antocianos totales como los compuestos polifenólicos más importantes para explicar la CA *in vitro* de este tipo de muestras. Por otra parte, en el capítulo anterior de esta tesis (**Figura 2.4, Sección 2.3.4**) se observó que los compuestos antocianos eran importantes para diferenciar las variedades a lo largo de todo el proceso de vinificación, brindando evidencia adicional de que la CA está influenciada por el tipo y contenido de compuesto polifenólico.

De acuerdo a los diferentes tipos de contribuciones (positiva y negativa) de los compuestos polifenólicos observadas en este estudio mediante el ARM, y teniendo en cuenta la posibilidad de que los polifenoles pueden actuar como antioxidantes o pro-oxidantes, podría explicarse que los compuestos con contribución positiva a la CA estarían actuando de manera sinérgica o aditiva en las muestras y, por lo tanto, demostrando un efecto antioxidante; mientras que aquellos compuestos con contribución negativa, probablemente estén actuando de manera antagónica y, por lo tanto, estén ejerciendo un efecto pro-oxidante, disminuyendo de esta manera la CA global de las muestras.

En bibliografía hay trabajos que demuestran que los polifenoles pueden actuar como antioxidantes o pro-oxidantes (Braicu *et al.*, 2013; Chedea *et al.*, 2010). Samra *et al.* (2011), han demostrado que los compuestos con fuerte poder para captar radicales libres se oxidan a potenciales relativamente bajos. Sin embargo, los compuestos con mayor poder reductor son aquellos polifenoles con bajo potencial de reducción y pueden, por auto-oxidación, ejercer su actividad pro-oxidante. Estos autores y Choueiri *et al.* (2012) evaluaron la actividad antioxidante *in vitro* de diferentes mezclas de polifenoles mediante la capacidad de captación de radicales libres (H_2O_2), encontrando que el efecto antioxidante y/o pro-oxidante fue dependiente del tipo y cantidad de compuesto presente. Así por ejemplo, la eficiencia antiradicalaria de la mezcla equimolar de (+)-catequina y quercetina mostró una IC_{50} mayor a la de los compuestos por separado, evidenciando un efecto antagónico entre ambos compuestos y, en consecuencia, un comportamiento pro-oxidante de la mezcla en comparación a los compuestos por separado. Además diferentes proporciones de los compuestos en estas mezclas dieron resultados diferentes, mostrando más o menos CA (Choueiri *et al.*, 2012). Por lo tanto, el equilibrio entre efectos antioxidantes y pro-oxidantes de estos compuestos es altamente sensible y dependiente del medio que los rodea, por lo que es muy complejo de estudiar y dilucidar (Samra *et al.*, 2011). En consecuencia, los resultados obtenidos en esta parte de la tesis estarían sugiriendo que la CA sería el resultado de la combinación de efectos antioxidantes/pro-oxidantes de cada compuesto polifenólico presente en la muestra.

3.4 Conclusiones Parciales

En esta segunda parte de la tesis se estudió la capacidad antioxidante (CA) *in vitro*, mediante los ensayos FRAP, ABTS y DPPH, de distintas muestras tomadas a lo largo del proceso de vinificación de tres variedades tintas *V. vinifera* L. cv. Syrah, Merlot y Cabernet Sauvignon cultivadas en Argentina.

Los resultados obtenidos del estudio de la CA mostraron diferencias significativas entre muestras, sin embargo ninguna variedad se caracterizó por demostrar la mayor CA en todas las etapas estudiadas del proceso de vinificación.

Mediante la utilización de técnicas estadísticas multivariadas, ACC y ARM, se demostró la alta influencia del perfil polifenólico en la CA de las muestras, permitiendo de esta manera explicar la bioactividad de las mismas. Los resultados obtenidos mostraron que los compuestos más importantes para explicar la CA dependieron del tipo de muestra analizada, y las diferencias cuantitativas de los mismos permitieron explicar las diferencias observadas entre variedades y tipo de muestras. Entre estos compuestos, los flavanoles y antocianos fueron los principales grupos señalados con contribución significativa a dicha propiedad. Asimismo, los resultados obtenidos del ARM estarían sugiriendo que la CA de las muestras sería el resultado de la combinación de efectos antioxidantes/pro-oxidantes que estos compuestos ejercen sobre las mismas.

Finalmente, sumado a su amplio contenido y gran variedad de compuestos polifenólicos (**Sección 2.3, CAPÍTULO 2**), es importante destacar la alta capacidad antioxidante demostrada por los orujos, resultado que podría impulsar a la revalorización de este residuo agroindustrial como una fuente rica, natural y económica para la obtención de compuestos bioactivos.

CAPÍTULO 4

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE *IN VIVO* DE LA UVA,
EL ORUJO Y EL VINO DE TRES
VARIETADES TINTAS**

Vitis vinifera L.



4.1 Antecedentes

Como vimos en la sección anterior, entre las técnicas más frecuentemente utilizadas para medir el poder antioxidante de un compuesto puro, extracto o alimento funcional se encuentran los métodos químicos *in vitro*, como por ejemplo FRAP, ABTS y DPPH. 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).

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).

Entre los cultivos celulares empleados, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un modelo eucariota ampliamente utilizado para el estudio de la capacidad antioxidante *in vivo* de compuestos puros y antioxidantes naturales exógenos (Dani *et al.*, 2008). El amplio uso de este modelo se debe a que su secuencia genómica ha sido completamente dilucidada y además es un organismo muy fácil de manipular genéticamente permitiendo el desarrollo de cepas mutantes lo que permitiría, por ejemplo, la identificación de genes centinelas involucrados en los mecanismos de respuesta a diferentes tipos de fármacos y estrés (Kim *et al.*, 2005). Por otro lado, el 30 % de los genes asociados a enfermedades en el hombre son ortólogos con genes de la levadura y, por lo tanto, funcionalmente homólogos (Manager & Winderickx, 2005). La utilización de este modelo biológico ha permitido comprender los procesos celulares y metabólicos fundamentales involucrados en enfermedades asociadas al estrés

oxidativo en el hombre, como las neurodegenerativas (Bastow *et al.*, 2011) y el envejecimiento celular (Herrero *et al.*, 2008).

En este sentido, la levadura ha sido ampliamente utilizada como modelo de referencia para estudiar la respuesta celular a EROs (Costa & Moradas-Ferreira, 2001), ya que este microorganismo responde a cambios redox intracelulares a través de la inducción de una compleja maquinaria antioxidante (Herrero *et al.*, 2008). En situaciones de estrés oxidativo, la defensa constitutiva no es suficiente para detoxificar las EROs, y la levadura induce una respuesta adaptativa para poder sobrevivir. Esta adaptación involucra por un lado la inducción del sistema antioxidante endógeno pre-existente. Así por ejemplo, se incrementa la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR). Por otro lado, se genera una respuesta tardía que proporciona una protección más eficiente mediante la activación de vías de señalamiento intracelular y factores de transcripción específicos que aumentan la expresión de genes que codifican para nuevas proteínas antioxidantes que eliminan EROs, reparan biomoléculas oxidadas, y restauran el equilibrio redox celular (Costa & Moradas-Ferreira, 2001). La misma involucra la coordinación de las respuestas de los factores de transcripción Yap1p, Skn7p, Msn2p y Msn4p (Farrugia & Balzan, 2012).

En los últimos años, *S. cerevisiae* ha sido utilizada para el estudio de la capacidad antioxidante *in vivo* de una amplia variedad de alimentos ricos en compuestos polifenólicos, entre los que se mencionan extracto de té verde (Maeta *et al.*, 2007), jugo de uva rosada (Dani *et al.*, 2009), extracto de repollo colorado (Lante *et al.*, 2011), cacao en polvo (Martorell *et al.*, 2011), trigo (Frassinetti *et al.*, 2012; Podio, 2015), extractos y decocciones de yerba mate (Bracesco *et al.*, 2003; Cheminet, 2013), extracto de semillas de uva blanca y tinta (Igneia *et al.*, 2013), jugo de naranja (Stinco *et al.*, 2014), vinos tintos y extracto de uva tinta (Baroni *et al.*, 2012; Bracesco *et al.*, 2007; López de Lerma *et al.*, 2013) y vino blanco y extracto de uva blanca (Dumitriu *et al.*, 2015; Stefenon *et al.*, 2010; Peinado *et al.*, 2013).

En la bibliografía existen algunos trabajos sobre la evaluación de la actividad antioxidante de vinos tintos, extractos de uvas y orujos tintos utilizando distintos modelos de cultivo celular. Algunos autores han demostrado que este tipo de muestras son capaces de reducir los niveles de EROs intracelulares incrementando la resistencia al daño oxidativo generado en una línea celular humana (Martín *et al.*, 2011). Otros, mediante la utilización de *S. cerevisiae*, señalan que estas muestras ejercerían su efecto protector mediante la inducción

de las enzimas antioxidantes como GPx y GR (Baroni *et al.*, 2012). Jiménez *et al.* (2010) observaron que las fracciones de antocianos purificadas del vino ejercerían su efecto protector en *S. cerevisiae* mediante la activación de los reguladores de respuesta a estrés Yap1p y Msn2p (Jiménez *et al.*, 2010), lo cual indicaría que una importante regulación a nivel transcripcional sería inducida por este tipo de compuestos (Fernández-Pachón *et al.*, 2009). En este sentido, Cigut *et al.* (2011) encontraron que extractos fenólicos de propóleo produjeron cambios a nivel de proteoma mitocondrial en la levadura, específicamente en la expresión de proteínas antioxidantes y proteínas involucradas en la síntesis del ATP.

A pesar de la evidencia existente sobre la bioactividad del vino tinto, y el extracto polifenólico de uvas y orujos, los mecanismos por los cuales estas muestras serían capaces de reducir el estrés oxidativo no han sido claramente dilucidados. No se han encontrado estudios que investiguen cómo se modifica a lo largo del proceso de vinificación la capacidad antioxidante *in vivo* de la uva. Por otro lado, muy pocos autores intentan explicar la capacidad antioxidante *in vivo* a partir de la contribución relativa de cada uno de los compuestos polifenólicos antioxidantes presentes en estas muestras (Baroni *et al.*, 2012). Asimismo, no se han encontrado trabajos en bibliografía que investiguen los cambios a nivel de proteoma celular en *S. cerevisiae* que permitan avanzar en el entendimiento de los mecanismos de acción por los cuales estos compuestos serían capaces de reducir el estrés oxidativo.

Por estos motivos, en esta tercera parte de la tesis se plantea estudiar la capacidad antioxidante *in vivo* de la uva, el orujo, y el vino de tres variedades tintas *V. vinifera* L. cv. Syrah, Merlot y Cabernet Sauvignon cultivadas en Argentina. Mediante ensayos de sobrevida, de oxidación intracelular, medición de la actividad de enzimas antioxidantes y estudios de cambios a nivel de proteoma celular en *S. cerevisiae* se busca indagar sobre los mecanismos de acción por los cuales estas muestras ricas en compuestos polifenólicos ejercen su bioactividad. Aplicando ARM se investiga la relación entre el comportamiento bioactivo y el perfil polifenólico encontrado en cada etapa del proceso analizado, de manera de identificar los compuestos claves para explicar la bioactividad de las muestras. Adicionalmente, por medio de la utilización de la línea celular HepG2 se evalúa la capacidad antioxidante de los vinos de manera de brindar evidencia adicional del comportamiento bioactivo de este alimento.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Estándares y Reactivos

Para la determinación de la capacidad antioxidante *in vivo* se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC36900 (American Type Culture Collection). El H₂O₂ utilizado fue de Merck (Alemania). El agar-agar, extracto de levadura y peptona de carne fueron obtenidos de Laboratorio Britania (Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina). En los ensayos de oxidación intracelular se utilizó DCFH-DA (2',7'-diclorofluoresceína diacetato) de Sigma Aldrich (Buenos Aires, Argentina). Los reactivos empleados en los estudios proteómicos fueron grado electroforesis o biología molecular. Acrilamida, bis-acrilamida, CHAPS, DTT (DL-dithiothreitol), IAA (iodoacetamida), SDS (dodecilsulfato de sodio), Precision Plus Protein Unstained y urea fueron obtenidos de Bio-Rad (China). El cóctel de inhibidores de proteasas (código: 87785) fue obtenido de Thermo Scientific (USA). Provistos por GE Healthcare (Alemania) fueron los siguientes reactivos: 2-D Clean-Up kit, buffer IPG 3-11 NL y las tiras IPG 3-11 NL 13 cm de longitud. Para la digestión de proteínas, se utilizó tripsina modificada grado secuenciamiento provista por Promega. El PVP (polyvinylpyrrolidona, código: PVP40-50G) fue obtenido de Sigma Aldrich (Buenos Aires, Argentina). Todos los demás reactivos químicos fueron de alta pureza y se obtuvieron de Sigma Aldrich (Buenos Aires, Argentina). El agua utilizada para las determinaciones fue ultra pura (< 5 µg/ L TOC y conductividad de 0,055 µS/ cm), obtenida de un sistema de purificación Arium 61316-RO acoplado a un sistema Arium 611-UV (Sartorius, Alemania).

4.2.2 Muestras de estudio

Las muestras estudiadas en este capítulo fueron los extractos de uva y orujo (previamente secados con corriente de nitrógeno y redisueltos en una solución de DMSO al 35 % v/v), y los vinos. Dichas muestras correspondieron a a las mismas que se utilizaron para el estudio de compuestos polifenólicos (**Sección 2.2.3, CAPÍTULO 2**).

4.2.3 Determinación de la Capacidad Antioxidante *in vivo*

Mediante la utilización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico, se estudió la CA *in vivo* y se indagó en los mecanismos de acción biológica de las muestras para atenuar el estrés oxidativo inducido por H₂O₂, evaluando la respuesta de la levadura mediante diferentes parámetros.

4.2.3.1 Ensayo de sobrevida

El ensayo de sobrevida de *S. cerevisiae* se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Baroni *et al.* (2012). Brevemente, las células de *S. cerevisiae* se cultivaron en medio nutritivo YPD líquido (1 % de extracto de levadura, 2 % de peptona y 2 % de glucosa) durante 16 h a 30 °C utilizando un agitador orbital KLINE (VICKING, Argentina) a 160 rpm (relación erlenmeyer: medio YPD, 5: 1). Las células de levadura aclimatadas y en la fase exponencial de crecimiento (Abs_{600nm} : 0,5 a 0,7) se inocularon en medio YPD fresco hasta alcanzar una Abs_{600nm} entre 0,2-0,3. Un total de 4 tratamientos diferentes fueron evaluados sobre estas células:

1- control negativo: levaduras en presencia del disolvente de los compuestos polifenólicos en las muestras (DMSO al 35 % v/v en el caso de extractos de uva y orujo, y etanol al 12 % v/v en el caso de vinos);

2-control de la muestra: levaduras con dosis optimizadas de PT aportados por las muestras en estudio (0,3 µg EAG/ mL de PT para los extractos de uvas; 1,0 µg EAG/ mL de PT para los extractos de orujos; y 98,0 µg EAG/ mL de PT en el caso de los vinos);

3-control positivo: levaduras, que en presencia del disolvente de los compuestos polifenólicos, se exponen a H_2O_2 2 mM como agente oxidante para inducir estrés oxidativo;

4- levaduras pre-tratadas con las muestras en estudio, seguida de la exposición a H_2O_2 2mM.

El tratamiento de las levaduras con las muestras en estudio se realizó durante 15 min a 30 °C/ 160 rpm; la exposición al H_2O_2 se realizó durante 1 h a 30 °C/ 160 rpm.

Para evaluar la sobrevida o viabilidad celular de cada tratamiento, las células fueron apropiadamente diluidas, sembradas en medio YPD sólido (YPD líquido con 2 % agar) e incubadas a 30 °C durante 72 h. Finalmente se realizó el recuento de las colonias expresando los resultados como % de sobrevida, considerando el 100 % de sobrevida al número de colonias de las placas del control negativo. El número de colonias en cada placa fue entre 150 y 200 (Silva *et al.*, 2005). Todos los tratamientos evaluados se realizaron por triplicado y al menos tres ensayos independientes fueron realizados.

Cabe aclarar que la concentración de H₂O₂ utilizada fue determinada en ensayos previos de exposición de las células a concentraciones crecientes de H₂O₂. La concentración seleccionada (2 mM) fue aquella que permitió un 50 % de sobrevivencia. Asimismo, se determinaron las dosis óptimas de PT de las muestras, en este caso exponiendo a las células a concentraciones crecientes de PT aportados por las mismas. Las dosis óptimas seleccionadas correspondieron a concentraciones de PT no citotóxicas por sí mismas para la levadura y que demostraron la mayor tasa de sobrevivencia en comparación a la levadura expuesta a H₂O₂ (2 mM). Los resultados obtenidos durante estos ensayos para la optimización de la metodología son desarrollados y discutidos en la sección de resultados y discusión de esta tesis.

4.2.3.2 Determinación de la oxidación intracelular

La oxidación intracelular se determinó por fluorescencia utilizando la sonda 2'7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). La DCFH-DA atraviesa fácilmente la membrana celular. Dentro de la célula, sus dos enlaces ésteres son clivados por esterasas intracelulares dando lugar a la 2'7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF), un producto polar que queda por lo tanto retenido en el interior celular. La H₂DCF acumulada es susceptible de oxidación por las especies reactivas de oxígeno (EROs) intracelulares, dando lugar al compuesto fluorescente 2'7'-diclorofluoresceína (DCF). El incremento en la fluorescencia es proporcional a la oxidación intracelular o niveles de EROs (Royall & Ischiropoulos, 1993; Wrona *et al.*, 2005).

Procedimiento. La oxidación intracelular en *S. cerevisiae* de los 4 tratamientos en estudio se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Doudican *et al.* (2005) con modificaciones menores. Brevemente, una alícuota de 700 µL de células tratadas se centrifugó a 14.000 x g durante 5 min a 4 °C. Las células sedimentadas, se lavaron dos veces y se resuspendieron en 700 µL de buffer 10 mM Tris-HCl pH 7,4, conteniendo 100 mM NaCl y 1 mM EDTA. Luego se agregó la sonda DCFH-DA (solución stock 5 mM en etanol absoluto) a una concentración final de 20 µM, y las células se incubaron durante 30 min a 30 °C en oscuridad utilizando un agitador orbital de KLINE (VICKING, Argentina) a 160 rpm. Finalizado este tiempo, las células se sedimentaron por centrifugación a 14.000 x g durante 5 min a 4 °C, se lavaron dos veces, se resuspendieron en 500 µL del buffer y se lisaron utilizando perlas de vidrio de 1 mm de diámetro (1 g de perlas) en tres ciclos, alternando 1 min de agitación vigorosa en vortex (Decalab, Argentina) y 1 min de enfriamiento en hielo. El debris celular se eliminó por centrifugación a 14.000 x g durante 5 min a 4 °C, y la fluorescencia del sobrenadante fue inmediatamente leída a 485 nm de excitación y 528 nm de

emisión en un lector de microplacas Synergy HT (BioTek, Estados Unidos). La fluorescencia se normalizó por la fracción de sobrevivida de cada muestra, y la oxidación intracelular se expresó como la relación entre la fluorescencia de la muestra y la fluorescencia de las células control. Todos los tratamientos se evaluaron por triplicado y al menos tres ensayos independientes fueron realizados.

4.2.3.3 Medición de la actividad de enzimas antioxidantes

Las enzimas antioxidantes de cada tratamiento se extrajeron de acuerdo a la metodología descrita por Baroni *et al.* (2012). Brevemente, las células tratadas se recogieron por centrifugación a 10.000 x g durante 10 min a 4 °C y se lavaron 2 veces con buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,2 conteniendo 150 mM NaCl y 50 mM EDTA). Las células lavadas (0,2 g) se suspendieron en buffer de lisis y se rompieron utilizando perlas de vidrio de 1 mm de diámetro (1 g de perlas) en tres ciclos, alternando 1 min de agitación vigorosa en vortex (Decalab, Argentina) y 1 min de enfriamiento en hielo. El debris celular se eliminó por centrifugación a 14.000 x g durante 15 min a 4 °C, y el sobrenadante obtenido se recuperó, se fraccionó en tubos y se almacenó a -80 °C hasta análisis. La actividad de glutatión peroxidasa (GPx) se determinó siguiendo la metodología descrita por Drotar *et al.* (1985) que se basa en la oxidación de glutatión reducido (GSH) por GPx, usando H₂O₂ como sustrato, acoplado a la desaparición de NADPH catalizada por glutatión reductasa (GR), determinado espectrofotométricamente a 340 nm. La actividad de GR se evaluó de acuerdo a Tanaka *et al.* (1994), cuya determinación se basa en la reducción del glutatión oxidado (GSSG) por GR a expensas de la desaparición del NADPH que se determina espectrofotométricamente a 340 nm. La actividad de las enzimas se calculó en términos del contenido de proteínas para cada muestra (2-3 µg proteínas/ µL extracto) (Bradford, 1976), y se expresó en nanokatales por miligramo de proteína (nkat/ mg prot), donde 1 kat es la conversión de 1 mol de sustrato por segundo. Cada medición enzimática y proteica se llevó a cabo por triplicado y tres ensayos enzimáticos independientes fueron realizados.

4.2.3.4 Estudios proteómicos por 2D-PAGE y MALDI-TOF/TOF

La *proteómica* es el campo de análisis del proteoma celular o conjunto de proteínas expresadas por un genoma en un determinado momento (Khan *et al.*, 2011); su objetivo principal es la identificación y caracterización de las proteínas que intervienen en la regulación del metabolismo celular. Entre las tecnologías que se utilizan para el análisis del proteoma celular, la electroforesis bidimensional permite separar las proteínas en un primer momento de

acuerdo a su punto isoeléctrico y luego según su peso molecular (Anderson *et al.*, 2000). Las proteínas separadas, son luego identificadas por espectrometría de masa y posterior estudio bioinformático de los resultados obtenidos.

Procedimiento. Los estudios proteómicos se llevaron a cabo con el vino de *Vitis vinifera* L. cv. Syrah. Se evaluaron los cambios en el proteoma celular de *S. cerevisiae* tratada con el vino Syrah, expuesta o no al H₂O₂.

1° Preparación de la muestra para 2D-PAGE. Las células de los diferentes tratamientos en estudio se recogieron por centrifugación a 10.000 x g durante 10 min a 4 °C y se lavaron cinco veces con buffer 50 mM Tris-HCl pH 8,0 contenido 8 M urea, 1 mM EDTA, 40 mM DTT y 0,1 % v/v Triton X-100. Las células lavadas (0,2 g) se suspendieron en buffer de lisis 50 mM Tris-HCl pH 8,0 contenido 8 M urea, 1 mM EDTA, 40 mM DTT, 0,1 % v/v Triton X-100, 1 mM PMSF, 1X cocktail de inhibidores de proteasas y 2 % p/v PVP, y se lisaron utilizando perlas de vidrio de 1 mm de diámetro (1 g de perlas) en cinco ciclos, alternando 1 min de agitación vigorosa en vortex (Decalab, Argentina) y 1 min de enfriamiento en hielo. El debris celular se eliminó por centrifugación a 14.000 x g durante 15 min a 10 °C, y el sobrenadante obtenido se recuperó, se fraccionó y se almacenó a -80 °C hasta análisis por electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2D-PAGE). Una alícuota de estos extractos proteicos se utilizó para determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976). El contenido osciló entre 2-3 µg de proteínas por µL de extracto.

2° 2D-PAGE. Las proteínas se separaron en una primera dimensión en función de su punto isoeléctrico, utilizando tiras comerciales con gradiente inmovilizado de pH (tiras IPG 3-11 NL de 13 cm) siguiendo la metodología indicada por el proveedor. Brevemente, una alícuota de los extractos proteico se purificó y concentró mediante 2-D Clean-Up kit (kit que permitió el 100 % de recuperación de las proteínas, determinado mediante ensayos previos de control de recuperación). Inmediatamente las proteínas se disolvieron en buffer de rehidratación (7M urea, 2M thiourea, 2% p/v CHAPS, 0,5% v/v buffer IPG 3-11 NL, 0,002% p/v azul de bromofenol). Las muestras en la solución de rehidratación se centrifugaron a 1.000 x g durante 2 min a temperatura ambiente y se cargaron (250 µL de solución conteniendo 100 µg de proteínas) en las tiras IPG 3-11 NL de 13 cm. La tira se rehidrató durante 16 h a temperatura ambiente (rehidratación pasiva). Finalizada la rehidratación, el isoelectroenfoco (IEF) de las proteínas se llevó a cabo en un separador bidimensional de

proteínas Agilent 3100 OFF-GEL (Agilent Technology) a 20°C, limitando la corriente por tira a 50 μ A como máximo y empleando el siguiente programa de voltaje: incremento lineal hasta 500 V en 1 h; incremento lineal hasta 1000 V en 1 h; incremento lineal hasta 8000 V en 2:30 h, hasta llegar a un total de 17 kVh. Luego del IEF, y previo a la segunda dimensión, las tiras se redujeron durante 15 min a temperatura ambiente con 5 mL de buffer de equilibrado (6M urea, 75 mM Tris-HCl pH 8,8, 29,3 % v/v glicerol, 2 % p/v SDS, 0,002 % p/v azul de bromofenol) suplementado con DTT (10 mg/ mL) y seguidamente se alquilaron durante otros 15 min con 5 mL de buffer de equilibrado suplementado con IAA (25 mg/ mL). Los geles equilibrados inmediatamente se sometieron a una segunda dimensión, en donde las proteínas se separaron de acuerdo a su peso molecular sobre geles de poliacrilamida (12 % p/v de acrilamida y 1,5 mm de espesor) en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), utilizando un equipo Protean II xi Cell (Bio-Rad, USA). La electroforesis se llevó a cabo a 25 mA/ gel durante 15 min y 35 mA/ gel el tiempo restante, hasta que el azul de bromofenol alcanzó la zona final del gel. El buffer de corrida empleado fue 25 mM Tris- 192 mM glicina- 0,1 % v/v SDS y la temperatura durante la corrida se mantuvo a 10 °C. Para la evaluación de los pesos moleculares de las proteínas separadas se utilizó Precision Plus Protein Unstained, una mezcla comercial de proteínas con peso molecular conocido (10 a 250 kDa). Finalizada la corrida electroforética bidimensional, las proteínas se fijaron durante 1 h con una solución conteniendo 40 % v/v de etanol y 10 % de ácido acético. Seguidamente los geles se tiñeron con azul brillante de coomassie coloidal G-250 durante 12 h, y a continuación se decoloraron con agua ultra pura. Tres réplicas experimentales de cada tratamiento fueron obtenidas.

3• Obtención y análisis de las imágenes de los geles. Finalizada la decoloración de los geles, las imágenes de las proteínas separadas se obtuvieron inmediatamente utilizando el equipo EC3 Imaging System (UVP). Las mismas se analizaron utilizando el programa para análisis de geles bidimensionales Melanie (versión 6.0; GENE BIO, USA). El análisis cuantitativo de los geles se llevó a cabo de acuerdo a las indicaciones del programa. Las proteínas se cuantificaron en base a sus volúmenes normalizados (respecto a todos los *spots* de proteínas en el gel). Se evaluó la reproducibilidad entre las réplicas experimentales de un mismo tratamiento obteniéndose $r \geq 0,80$. Finalmente, se buscaron las proteínas con expresión diferencial entre tratamientos. En este sentido, las proteínas se consideraron diferencialmente expresadas cuando la diferencia entre las intensidades fue significativamente ($p < 0,05$) mayor a 2,0.

4° Análisis MALDI-TOF/TOF e identificación de proteínas. Los *spots* de proteínas con expresión diferencial fueron manualmente cortadas y extraídas de los geles para su análisis por MALDI-TOF/TOF. Se siguió la metodología propuesta por Shevchenko *et al.* (2006) para la digestión *in gel* de las proteínas. Brevemente, previo a la digestión los *spots* se lavaron, se redujeron y alquilaron. La digestión proteolítica de cada *spot* se llevó a cabo por agregado de 10 μL de una solución de tripsina de concentración 10 ng/ μL en bicarbonato de amonio 50 mM, durante 16 h a 37 °C con agitación suave. La mezcla de péptidos resultante se extrajo con una solución 0,5 % v/v TFA (ácido trifluoroacético) en 50 % v/v ACN (acetonitrilo). Los péptidos en solución se concentraron en Speed Vac a 30 °C. Una alícuota de 0,5 μL se dispensó sobre una placa de MALDI (MTP AnchorChip) con 0,5 μL de solución matriz CHCA (α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid) (3 mg/ mL de CHCA en solución 0,1 % TFA en 70 % ACN). La mezcla de péptidos se analizó en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF Ultraflex II (Bruker Daltonics, USA) operado en modo ion reflector positivo y calibrado con una mezcla estándar de péptidos de Bruker Daltonics (Service Kit 1 #225993). Las proteínas se identificaron por comparación de los espectros de MS y MS/MS contra bases de datos de proteínas utilizando MASCOT (Matrix Science <http://www.matrixscience.com/search>) como programa de búsqueda. La identificación de las proteínas se llevó a cabo con los siguientes parámetros de búsqueda: base de datos: NCBIInr; enzima: tripsina; sitios de corte tripticos perdidos: 2; tolerancia de masa monoisotópica: 200 ppm; tolerancia de masa de los fragmentos: 0,8 Da; modificación fija: carbamidometilación; modificación variable: oxidación de metioninas. Los parámetros masa de la proteína y taxonomía no fueron restringidos. Puntajes significativos ($p < 0,05$) se utilizaron como criterio para identificar correctamente las proteínas. Los análisis fueron realizados en CEQUIBIEM- UBA.

4.2.4 Determinación de la Capacidad Antioxidante en células HepG2

Mediante la utilización de células HepG2 se estudió la CA de las tres variedades de vinos tintos evaluando la respuesta al estrés oxidativo inducido por H_2O_2 mediante el ensayo del MTT.

4.2.4.1 Ensayo del MTT

Este ensayo permite evaluar la sobrevivencia o viabilidad celular debido a la capacidad de las células viables para reducir la sal soluble del MTT (bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico) a una sal insoluble de color púrpura que se determina por

espectrofotometría. El MTT penetra en las células y es reducido por la enzima succínico dehidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazán. La cantidad de MTT reducido es cuantificado mediante un método colorimétrico, ya que la reacción produce un cambio de coloración del amarillo al violeta y precipita. Este precipitado se re-disuelve en DMSO. La capacidad de las células para reducir al MTT a un producto coloreado, constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y la actividad funcional de dicha organela es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La producción de color se determina a 540 nm (Fotakis & Timbrell, 2006).

Procedimiento. El ensayo se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Mosmann (1983) con modificaciones menores. Brevemente, las células se inocularon ($2,34 \cdot 10^4$ células) en MEM suplementado con 10 % de FBS y 0,1 % de solución antimicótica (penicilina 10.000 unidades/ mL, streptomycin 10 mg/ mL) e incubaron durante 24 h para su aclimatación. Luego de este tiempo, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 200 μ L de medio de cultivo fresco con vino al 1 % v/v (14,00 μ g/ mL PT). Luego de 1 h de tratamiento, se agregó H_2O_2 en una concentración final de 500 mM (concentración de oxidante suficiente para producir 50 % de muerte celular) y se incubó por un tiempo adicional de 30 min. Se realizaron tres grupos control: control negativo, correspondiente a las células sin tratamiento, control positivo o células con estrés oxidativo inducido por 500 mM de H_2O_2 , y control de las muestras, que implica el tratamiento de las células con las distintas variedades de vino solamente. Finalizado el tiempo de incubación, se eliminó el medio de cultivo con los tratamientos, se añadieron 100 μ L de una solución de 5 mg/ mL de MTT y se incubó durante 4 h a 37 °C. Luego de este período, la solución de MTT se desechó y se añadieron 200 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO). Se leyó la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas (Aparato Multiskan FC - Thermo Scientific). Los resultados se expresaron como % de sobrevivencia correspondiendo la absorbancia del control negativo al 100 % de sobrevivencia. Todos los tratamientos se evaluaron por triplicado y se realizaron tres ensayos independientes. El ensayo fue realizado en la Universidad Estadual Júlio Mesquita Filho (UNESP), Rio Claro, Brasil (Centro de Ciencias Biológicas, Departamento de Biología, Rio Claro, San Pablo, Brasil).

4.2.5 Análisis Estadísticos de los datos

El análisis estadístico de los datos generados en este capítulo de la tesis se realizó mediante la utilización de los programas InfoStat (versión 2014p) y STATISTICA (versión 7.1).

4.2.5.1 Estadística Descriptiva

De acuerdo a la **Sección 2.2.5.1** del **CAPÍTULO 2**, los valores obtenidos en las diferentes determinaciones analíticas de este capítulo son expresados como la media \pm desviación estándar.

4.2.5.2 Estadística Inductiva- Análisis de la Varianza (ANOVA)

De acuerdo a la **Sección 2.2.5.2** del **CAPÍTULO 2**, el ANOVA se aplicó a los valores obtenidos en las determinaciones analíticas 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 y LSD Fisher.

4.2.5.3 Estadística Multivariada

4.2.5.3.1 Análisis de Correlación Canónica (ACC)

El ACC se utilizó para evaluar la relación entre el perfil fenólico (agrupado por familias de compuestos) y la CA medida por los ensayos *in vivo* con *S. cerevisiae* (sobrevida y actividad de enzimas) en cada tipo de muestra. El ACC se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito en la **Sección 3.2.4.3.2** del **CAPÍTULO 3**.

4.2.5.3.2 Análisis de Regresión Múltiple paso a paso (ARM *stepwise*)

El ARM *stepwise* se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito en la **Sección 3.2.4.3.3** del **CAPÍTULO 3**. El ARM además de brindar evidencia adicional sobre la relación entre el perfil fenólico y la CA medida por los ensayos de supervida y actividad de enzimas, se aplicó para estudiar mediante el análisis de los coeficientes de regresión Beta (β) la importancia de las variables predictoras, es decir, aquellos compuestos polifenólicos que explicarían de mejor manera la CA observada en las muestras.

4.3 Descripción de los resultados y discusión

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la capacidad antioxidante (CA) *in vivo* utilizando *S. cerevisiae* de muestras derivadas de la vinificación de tres variedades tintas *V. vinifera* L. cv. Syrah, Merlot y Cabernet Sauvignon. Las muestras analizadas fueron los extractos polifenólicos de las uvas y orujos. En el caso de los vinos, el producto se analizó sin tratamiento previo.

4.3.1 Capacidad Antioxidante *in vivo*

La CA *in vivo* se estudió utilizando la levadura *S. cerevisiae* en fase exponencial de crecimiento. Bajo estas condiciones, la levadura es muy sensible a agentes pro-oxidantes, debido a la represión catabólica ejercida por la glucosa sobre el sistema de defensa antioxidante (Pereira *et al.*, 2003). Sin embargo, como ha sido demostrado por Wilmsen *et al.* (2005), el previo tratamiento con un agente antioxidante aumentaría la tolerancia de la levadura al estrés oxidativo inducido por el pro-oxidante. En nuestro trabajo el agente pro-oxidante seleccionado para inducir un estrés oxidativo en la levadura fue el H₂O₂. El H₂O₂ es un potente agente pro-oxidante debido a que produce daño celular a través de la generación de radicales hidroxilos (HO[•]), una de las especies más reactiva y tóxica de EROs (**Figura 1.1, CAPÍTULO 1**). Además difunde dentro y entre las células, causando daños en las membranas, organelas, y también en el núcleo celular (Wilmsen *et al.*, 2005).

4.3.1.1 Sobrevida

Para llevar a cabo los estudios de CA *in vivo*, en primer lugar se procedió a la optimización de la metodología mediante ensayos de sobrevida, que implicaron la determinación de la dosis de las muestras que fuera capaz de revertir el daño oxidativo causado por el H₂O₂, sin producir toxicidad celular por sí misma. Para ello, se evaluó la sobrevida de las células expuestas a concentraciones crecientes de PT de las muestras en estudio (extractos de uva, extractos de orujo y vinos) en presencia de 2 mM de H₂O₂ (concentración determinada en ensayos previos que permitió un 54 % de sobrevida **Figura 4.1**). Para estos ensayos los tres tipos de muestras se prepararon a partir de una mezcla de las tres variedades en estudio, aportando cada una la misma cantidad de PT. La **Figura 4.1** muestra las distintas concentraciones ensayadas para cada una de las muestras, frente a un control negativo de las células sin exposición a H₂O₂ (C), y a un control positivo implicando la exposición de las células a 2 mM de H₂O₂ sin muestra (H₂O₂).

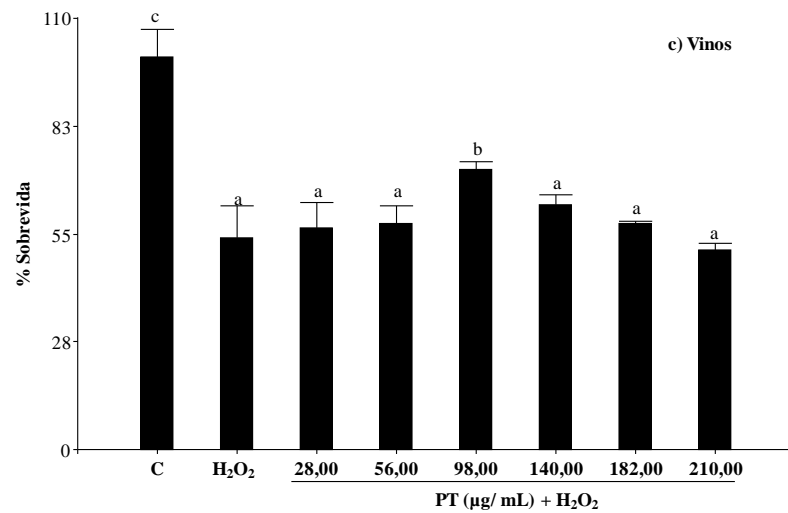
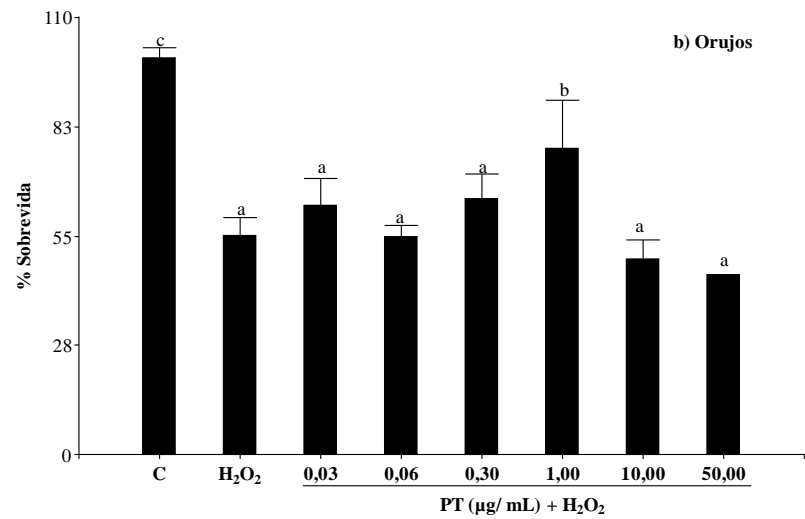
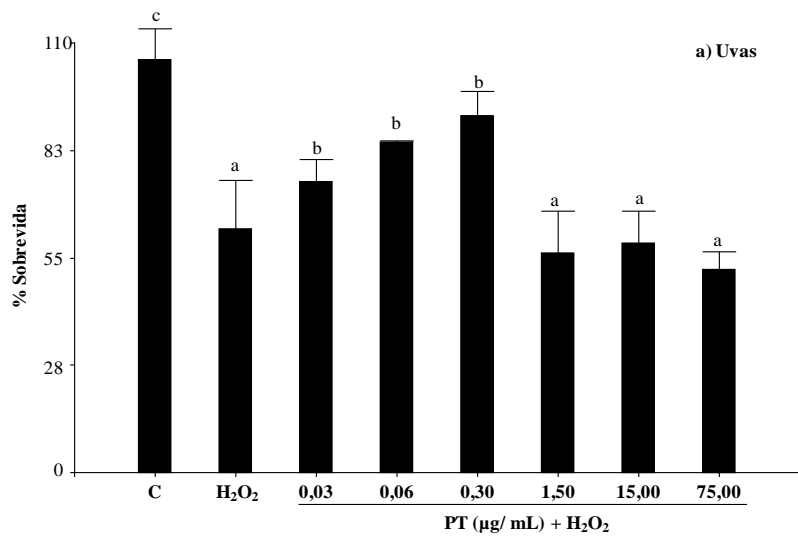


Figura 4.1. Porcentaje de sobrevivencia de *S. cerevisiae* expuesta a diferentes concentraciones de PT de las muestras en estudio. a) Uvas; b) Orujos; c) Vinos. C, control negativo (sin H₂O₂); H₂O₂, control positivo (con H₂O₂, sin muestra). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$).

Se estudiaron seis concentraciones diferentes de PT para cada muestra, las cuales fueron no citotóxicas para las levaduras. No todas las concentraciones de PT fueron capaces de rescatar a la levadura del daño oxidativo inducido. En general se observó que bajas concentraciones de PT no son suficientes para revertir el daño producido por el estrés oxidativo inducido en la levadura. Asimismo, altas concentraciones de PT tampoco ejercen un efecto protector frente al H₂O₂. Probablemente estas concentraciones en presencia de H₂O₂ sean tóxicas para la levadura. En el caso de los extractos de uva, la concentración de 0,3 µg EAG/ mL fue la seleccionada ya que logró la mayor tasa de recuperación de las células (**Figura 4.1a**). Cuando se analizaron los resultados para los extractos de orujos, se observó que solamente la concentración de 1,0 µg EAG/ mL logró diferenciarse respecto del control con H₂O₂, permitiendo de esta manera la mayor tasa de sobrevida (**Figura 4.1b**). Esto mismo se observó en el análisis de las muestras de vinos, siendo la concentración de 98,0 µg EAG/ mL la que demostró la mayor recuperación de las células (**Figura 4.1c**).

Se puede observar que la dosis de PT necesaria para atenuar el daño causado por el H₂O₂ a la levadura fue mucho mayor para los vinos en comparación a los extractos de uvas y orujos. Ha sido demostrado que la interacción de los polifenoles con proteínas disminuye su CA (Rohn *et al.*, 2004). El vino es un alimento complejo, en comparación a los extractos polifenólicos de uvas y orujos, por lo tanto la interacción de sus polifenoles con los distintos componentes de la matriz alimenticia podrían estar disminuyendo su CA, lo cual explicaría la necesidad de una mayor concentración de PT para ejercer su bioactividad. Estas dosis optimizadas de trabajo presentaron el mismo orden de magnitud que las empleadas por otros autores. Ignea *et al.* (2013) utilizaron 0,9 µg EAG/ mL y 9,0 µg EAG/ mL de PT para ensayar la sobrevida de extractos de semillas de diferentes variedades de uvas tintas *V. vinifera* L. cultivadas en Grecia. Asimismo, Baroni *et al.* (2012) utilizaron valores entre 92,0 µg EAG/ mL y 102,0 µg EAG/ mL de PT para evaluar la sobrevida de diferentes variedades de vinos tintos argentinos.

Luego de determinar la concentración no citotóxica de PT necesarios para atenuar el daño oxidativo producido por H₂O₂, se procedió a realizar los ensayos de sobrevida de las tres variedades en estudio para cada tipo de muestra. Un total de 4 tratamientos fueron estudiados en cada uno de estos ensayos:

- 1- un control negativo, que implica el tratamiento de las levaduras en presencia del disolvente de los polifenoles en las muestras (C),

2- un control de la muestra, en el cual se expusieron las levaduras a las distintas muestras,

3- un control positivo, en el cual se expusieron las levaduras a 2 mM de H₂O₂ en presencia del disolvente de los polifenoles,

4- levaduras pre-tratadas con las muestras en estudio, seguida de la exposición a H₂O₂.

La **Figura 4.2** muestra los resultados obtenidos para las tres muestras tomadas a lo largo de la vinificación de las tres variedades tintas *V. vinifera* L. estudiadas. El pre-tratamiento de las células con todas las muestras en estudio permitió proteger a la levadura del daño producido por el H₂O₂. En el caso de los extractos de uvas, la tasa de supervivencia incrementó entre el 14 % y el 20 % (**Figura 4.2a**) con respecto al control con H₂O₂, para orujos el incremento fue entre un 8 % y un 16 % (**Figura 4.2b**), y para vinos entre un 8 % y un 15 % (**Figura 4.2c**). Para todas las muestras se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las variedades, siendo Syrah la variedad que demostró el mayor poder para atenuar el daño causado por el agente pro-oxidante. Por otro lado, también pudo observarse que los controles de las muestras (tratamiento 2) no se diferenciaron del control negativo (C), lo cual es indicativo de que las muestras por sí solas no ejercen efecto citotóxico alguno sobre las células.

De acuerdo a los resultados obtenidos es importante destacar que, entre las diferentes muestras analizadas a lo largo de la vinificación, las uvas fueron las que lograron rescatar en mayor medida a la levadura del daño causado por el H₂O₂ con la menor concentración de PT. Asimismo, se observó que en todas las muestras analizadas, la variedad Syrah fue la que demostró la mayor protección frente a la toxicidad causada por H₂O₂.

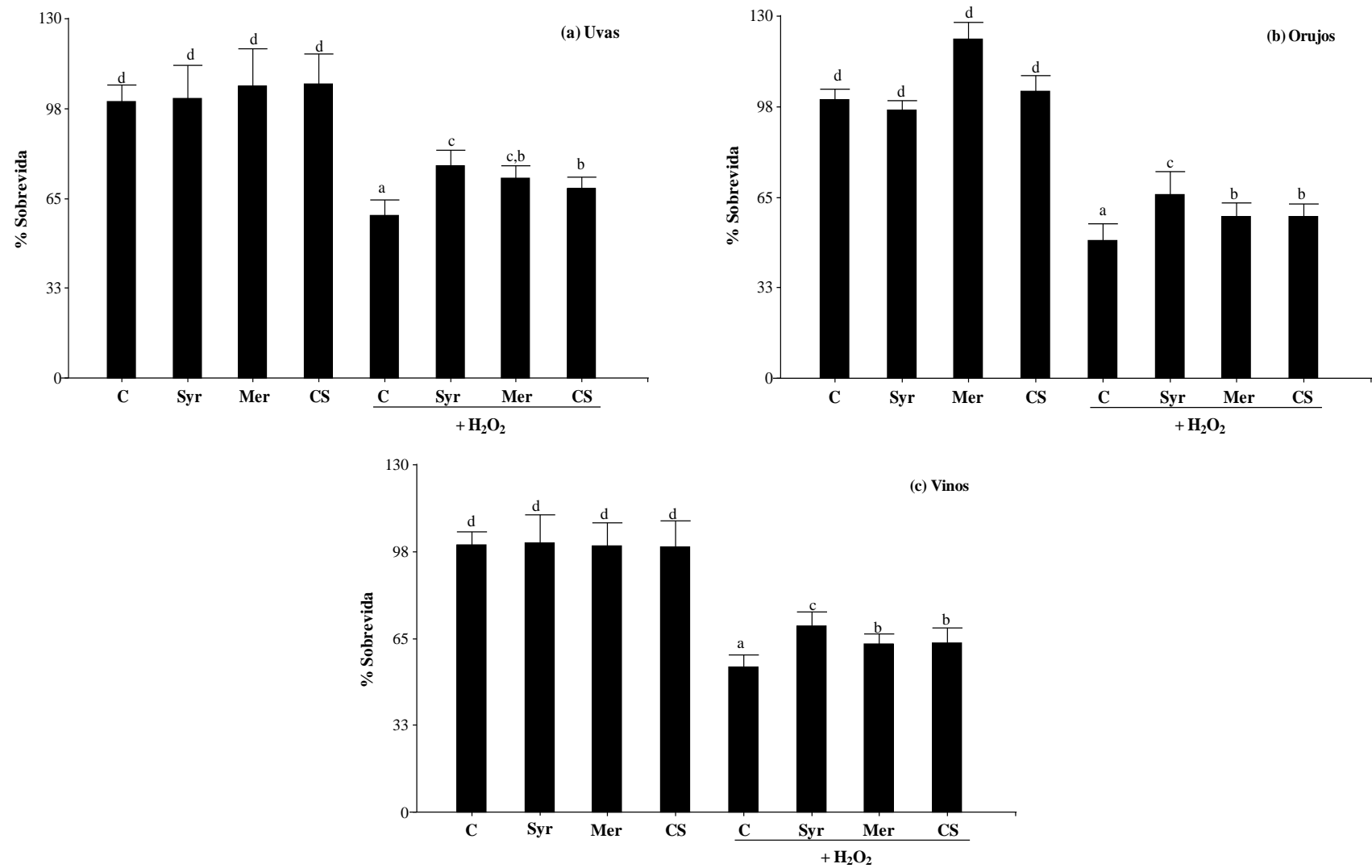


Figura 4.2. Porcentaje de sobrevida de *S. cerevisiae* tratada con las diferentes muestras, en presencia/ausencia de H₂O₂. Muestras: a) Uva; b) Orujos; c) Vinos. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0,01). Abreviaturas: Syr, Syrah; Mer, Merlot; CS, Cabernet Sauvignon.

Estudios previos han demostrado la capacidad del vino tinto y la uva para rescatar a *S. cerevisiae* del estrés oxidativo inducido. Baroni *et al.* (2012) observaron un incremento en la sobrevivencia respecto del H₂O₂ entre el 13 % y el 26 % para diferentes variedades de vinos tintos argentinos, advirtiendo diferencias estadísticamente significativas en la CA de las variedades. Más tarde, López de Lerma *et al.* (2013) demostraron que el extracto fenólico de la piel de la uva tinta *V. vinifera* L. cv. Tempranillo presentó mayor CA que su respectivo mosto, aunque esta conclusión fue alcanzada mediante el análisis cualitativo de la sobrevivencia de *S. cerevisiae*. Los resultados obtenidos en esta sección de la tesis demuestran la efectiva capacidad de la uva, el orujo y el vino para atenuar el daño causado por el H₂O₂. Además, se pone en evidencia que dicha capacidad es afectada por el proceso de vinificación y, que la variedad de la uva determinaría el poder bioactivo de las muestras a lo largo del proceso.

4.3.1.2 Oxidación Intracelular

El efecto protector de los compuestos polifenólicos en los sistemas biológicos ha sido relacionado a su capacidad para proteger contra el daño oxidativo celular inducido por las EROs. Con el fin de determinar si los polifenoles de la uva, el orujo, y el vino incrementan la viabilidad celular disminuyendo los niveles de EROs, se evaluó la oxidación intracelular por fluorescencia utilizando la sonda DCFH-DA. Esta sonda es susceptible de oxidación por diferentes EROs, particularmente H₂O₂ y radicales hidroxilos (He *et al.*, 2012), por lo que la evaluación de estas EROs intracelulares constituye un buen biomarcador de daño oxidativo y, en consecuencia, de cambios en el estado redox de la célula.

La **Figura 4.3** muestra los resultados obtenidos de la medición de la oxidación intracelular en *S. cerevisiae* bajo los diferentes tratamientos en todas las muestras en estudio.

Se puede observar que el tratamiento de la levadura con las diferentes muestras en estudio no modifica los niveles basales de oxidación intracelular en comparación a las células del control. Por otro lado, la exposición de las células al H₂O₂ produjo un incremento significativo en la oxidación intracelular en comparación a las células del control. Este aumento pudo ser revertido por el previo tratamiento de las levaduras con las diferentes muestras. En el caso de los extractos de uvas, la oxidación intracelular se redujo en un 28 % (**Figura 4.3a**) con respecto al control con H₂O₂, para orujos la reducción fue del 25 % (**Figura 4.3b**), mientras que para vinos fue del 42 % (**Figura 4.3c**).

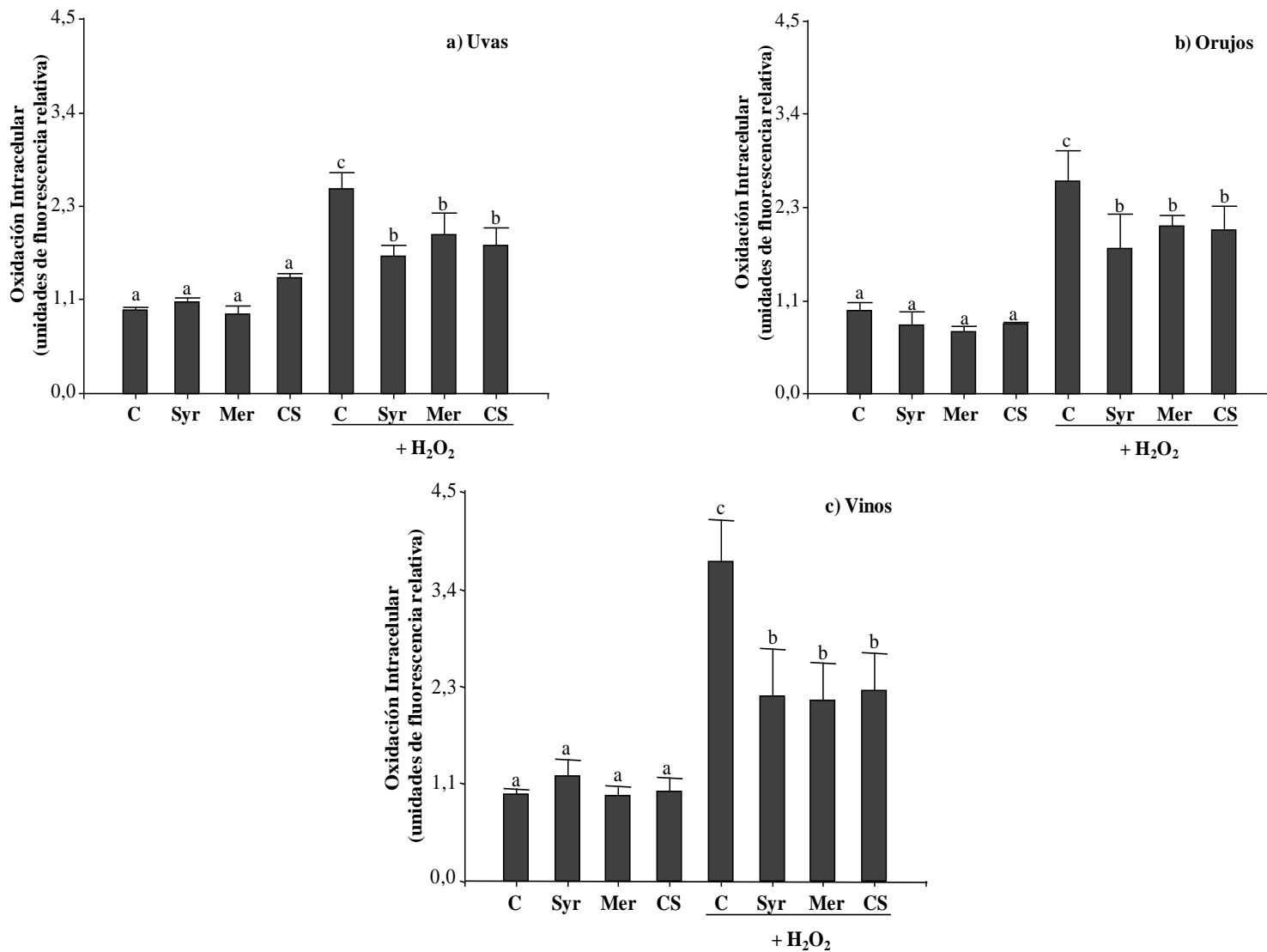


Figura 4.3. Oxidación intracelular en *S. cerevisiae* tratada con las diferentes muestras, en presencia/ausencia de H₂O₂. Muestras: a) Uva; b) Orujos; c) Vinos. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$). Abreviaturas: Syr, Syrah; Mer, Merlot; CS, Cabernet Sauvignon.

La comparación de estos resultados con los obtenidos en el ensayo de sobrevida demuestran que la reducción en la oxidación intracelular con el previo tratamiento de las distintas muestras en estudio, logró incrementar la tolerancia de las levaduras al daño oxidativo inducido, evidenciado por las mayores tasas de sobrevida observadas en la sección anterior (**Figura 4.2, Sección 4.3.1.1**).

Los resultados hasta aquí obtenidos demuestran que la uva, el orujo y el vino incrementan la resistencia de *S. cerevisiae* al H₂O₂ como consecuencia de la reducción en la oxidación intracelular. Dicha observación concuerda con estudios previos, donde diferentes autores mediante el mismo ensayo han observado la capacidad del trigo, de extractos polifenólicos de la uva blanca, y de diversos extractos de tejidos vegetales para reducir la oxidación intracelular inducida por H₂O₂ en *S. cerevisiae* (Frassinetti *et al.*, 2012; Peinado *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2009). Este efecto protector frente al estrés oxidativo inducido, o capacidad antioxidante, en un primer momento fue atribuido al poder intrínseco de captación de EROs de los compuestos polifenólicos presentes en los extractos y alimentos del reino vegetal (Belihna *et al.*, 2007). Sin embargo, la hipótesis de la acción directa de captación de radicales libres requiere la presencia de los compuestos polifenólicos antioxidantes en el lugar exacto de la célula donde los EROs son formados. Además se conoce que la velocidad de acción para captar radicales libres por parte de la maquinaria antioxidante endógena es mayor que la de los polifenoles (Fernández-Pachón *et al.*, 2009; Shih *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta estas consideraciones, es que muchas investigaciones se han dedicado al estudio y entendimiento de los mecanismos de acción *in vivo* por los cuales los compuestos polifenólicos demuestran un efecto protector frente al estrés oxidativo. Si bien hoy en día estos mecanismos no han sido claramente dilucidados (Araújo *et al.*, 2011), algunos estudios a nivel molecular han revelado que estos compuestos modularían la respuesta celular al interactuar de manera indirecta con el sistema de defensa antioxidante de la célula, tanto enzimático como no enzimático (Bayliak *et al.*, 2014; Jiménez *et al.*, 2010; Shih *et al.*, 2007; Yeh *et al.*, 2009).

4.3.1.3 Actividad de Enzimas Antioxidantes

Con el fin de evaluar los mecanismos de acción biológica inducidos por los polifenoles de la uva, el orujo, y el vino, se evaluó la capacidad de dichas muestras para inducir la actividad de enzimas antioxidantes en *S. cerevisiae*. El estudio se centró en las enzimas glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR), ambas implicadas en el

metabolismo de glutatión (GSH), por lo que constituyen importantes biomarcadores de los cambios en el estado redox de la célula (**Figura 1.1, CAPÍTULO 1**).

La **Figura 4.4** muestra los resultados obtenidos de la medición de la actividad de GPx y GR en *S. cerevisiae* bajo los diferentes tratamientos en todas las muestras en estudio.

En el caso de la enzima GPx, se observa que su actividad incrementó ante el tratamiento de las células con los extractos de uvas y las muestras de vinos, mientras que disminuyó con el tratamiento de los extractos de orujo en comparación con las células control. Por otro lado, se observó que la exposición de las células al H₂O₂ disminuyó la actividad de la enzima en comparación con las células control. Sin embargo, la actividad de esta enzima se vio aumentada por el pre-tratamiento con las muestras. La GPx está implicada en la detoxificación del H₂O₂ por medio de su conversión a agua mediante la oxidación de GSH.

En el caso de la actividad de GR, esta no se modificó cuando las células fueron tratadas con los extractos de orujo y las muestras de vino, aunque se observó un incremento frente al tratamiento con los extractos de uva en comparación con las células control. Al igual que con la actividad de GPx, la exposición de las células al H₂O₂ redujo la actividad de GR. Sin embargo, la actividad de dicha enzima fue incrementada con el pre-tratamiento de las células con las muestras en estudio. Esta enzima repone el glutatión reducido (GSH) cuando es oxidado en reacciones redox GSH-dependientes como en el caso de la actividad de GPx, lo cual estaría explicando el incremento observado en su actividad.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, la inducción de la actividad de las enzimas GPx y GR, como miembros del sistema de defensa antioxidante enzimático endógeno de la levadura, con respecto a las células con H₂O₂ podría ser uno de los mecanismos por los cuales estas muestras ricas en compuestos polifenólicos estarían ejerciendo su CA (**Figura 4.2 y 4.3**). Cabe destacar que se observaron diferencias en la inducción de ambas enzimas entre las variedades estudiadas. Syrah en general mostró la mayor inducción para las actividades de GPx y GR en todos los tipos de muestras (**Figura 4.4**), resultado que concuerda con la observación de que la variedad Syrah fue la que demostró las tasas de sobrevida más altas en la sección anterior para todas las muestras en estudio (**Figura 4.2, Sección 4.3.1.1**).

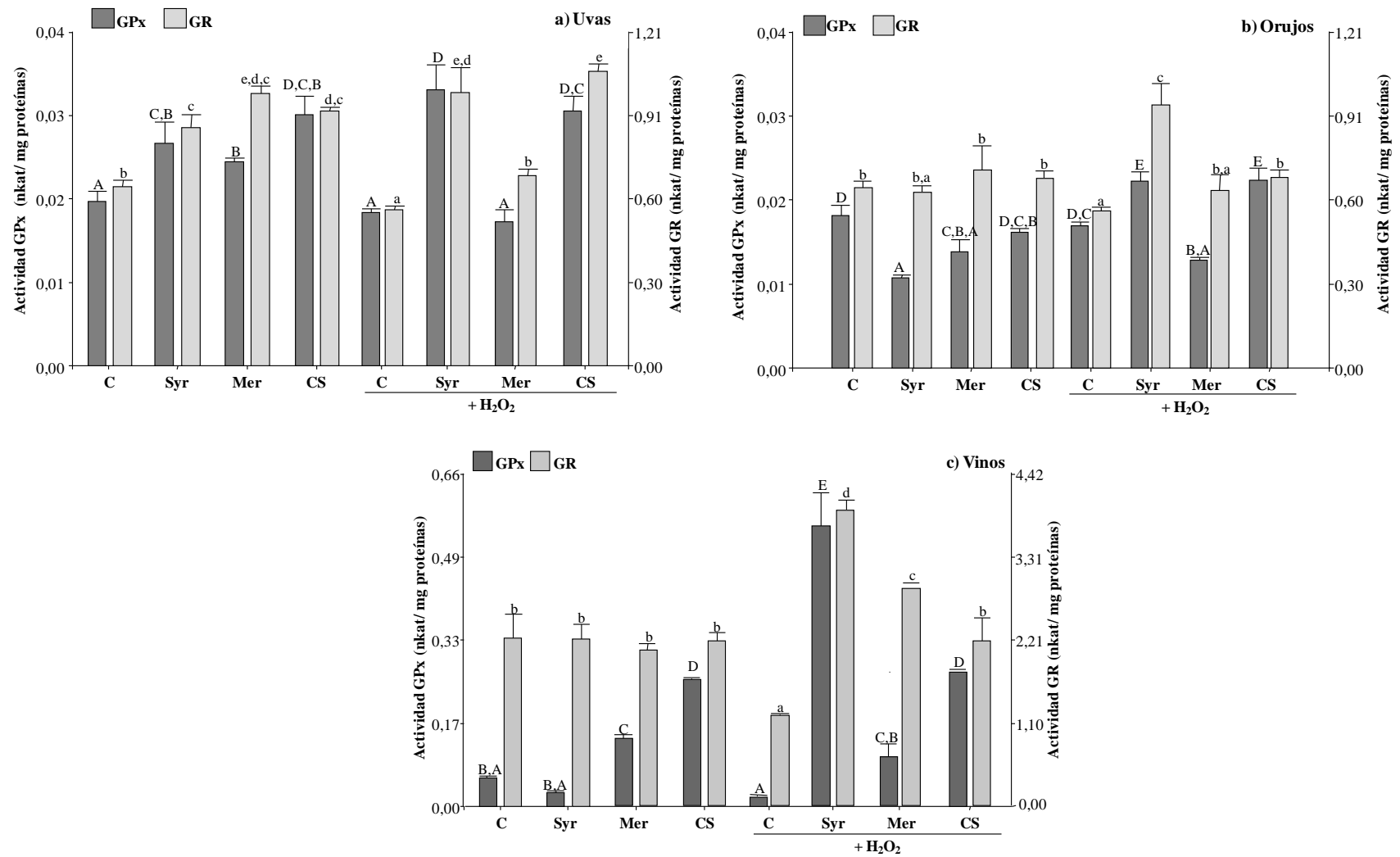


Figura 4.4. Actividad de enzimas GPx y GR en *S. cerevisiae* tratada con las diferentes muestras, en presencia/ausencia de H₂O₂. Muestras: a) Uva; b) Orujos; c) Vinos. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0,01). Abreviaturas: Syr, Syrah; Mer, Merlot; CS, Cabernet Sauvignon.

Por otro lado, la variedad Merlot mostró la inducción más baja de la actividad de GPx y GR en las células pre-tratadas con las muestras de dicha variedad, incluso en algunos casos estas actividades fueron iguales o más bajas que las observadas para las células expuestas al agente estresante. Esta actividad diferenciada entre variedades podría deberse a las diferencias observadas en el perfil de polifenoles de las muestras, tema que se abordará en la próxima sección de esta tesis.

4.3.2 Influencia de los compuestos polifenólicos en la Capacidad Antioxidante *in vivo*

Las diferencias observadas en la CA entre variedades podrían estar asociadas a las diferencias entre sus perfiles polifenólicos, ya que las levaduras fueron tratadas con la misma concentración de PT para cada variedad y según el tipo de muestra (**Sección 4.3.1.1**). Por lo tanto, con el fin de evaluar la correlación entre la actividad observada y el perfil polifenólico se aplicó un análisis de correlación canónica (ACC), entre la CA (determinada por la sobrevida y la actividad de GPx y GR) y las familias de compuestos polifenólicos (de acuerdo a la **Sección 2.3.4**) para cada tipo de muestra (uva, orujo y vino). Este análisis mostró una correlación significativa ($r > 0,95$; $p < 0,001$), indicando que el perfil polifenólico influye en la CA de las muestras y, por lo tanto, permitiría explicar las diferencias observadas entre variedades y muestras. Seguidamente, con el fin de identificar específicamente cuáles son los compuestos que contribuyen en mayor medida a la capacidad antioxidante *in vivo*, se realizó un análisis de regresión múltiple (ARM). Este análisis mostró nuevamente que existe una correlación significativa entre la CA y el perfil polifenólico (tasa de sobrevida: $r > 0,50$, $p < 0,05$; actividad GPx: $r > 0,76$, $p < 0,001$; actividad GR: $r > 0,75$, $p < 0,01$) para todos los tipos de muestras (uva, orujo, vino). Mediante el análisis de los coeficientes beta (β) para cada compuesto en cada regresión, se identificaron aquellos que mostraron la mayor contribución a la bioactividad de las muestras. En la **Figura 4.5** se puede observar la magnitud y el tipo de contribución (β) a la CA de los compuestos más importantes para la CA *in vivo* de las muestras. En la **Figura 4.6** se ilustra la asociación entre el contenido de estos compuestos y las tres variedades en estudio.

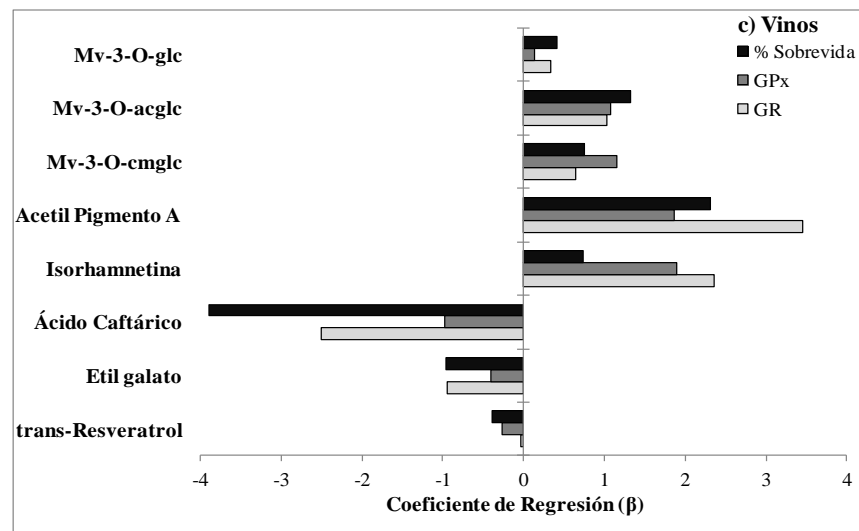
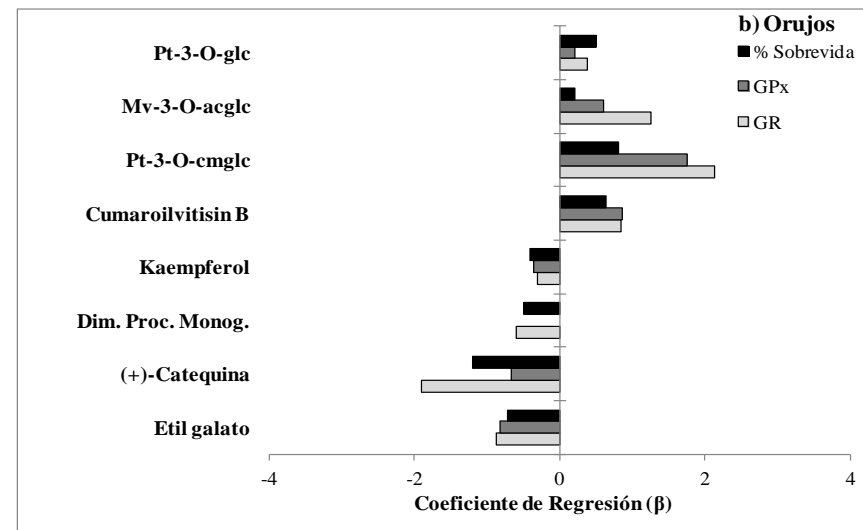
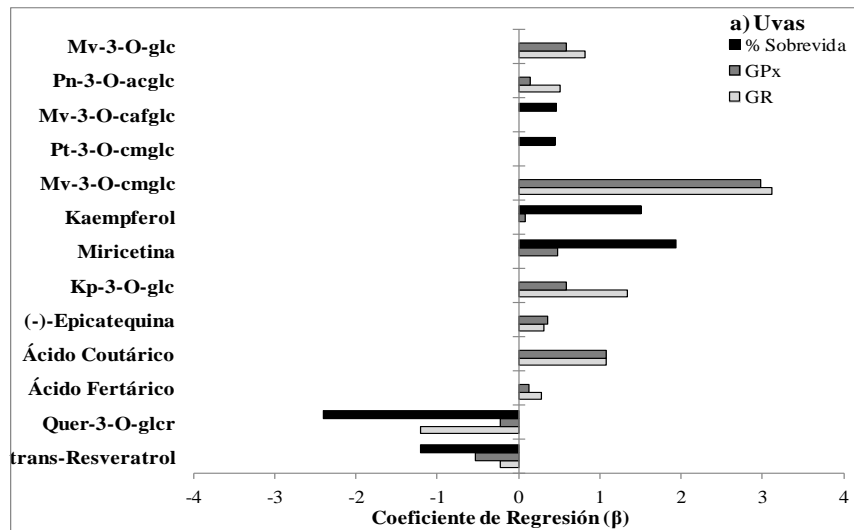


Figura 4.5. Contribución (dada por los Coeficientes β) de los compuestos más importantes para explicar la CA *in vivo* de las muestras tomadas a lo largo de la vinificación de tres variedades tintas *V. vinifera* L. a) Uvas; b) Orujos; c) Vinos. Abreviaturas: Mv, malvidina; Pn, peonidina; Pt, petunidina; glc, glucósido; ac, acetil; cm, cumaroil; Quer, quercetina; Kp, kaempferol; Dim. Proc. Monog., dímero de procianidina monogalato.

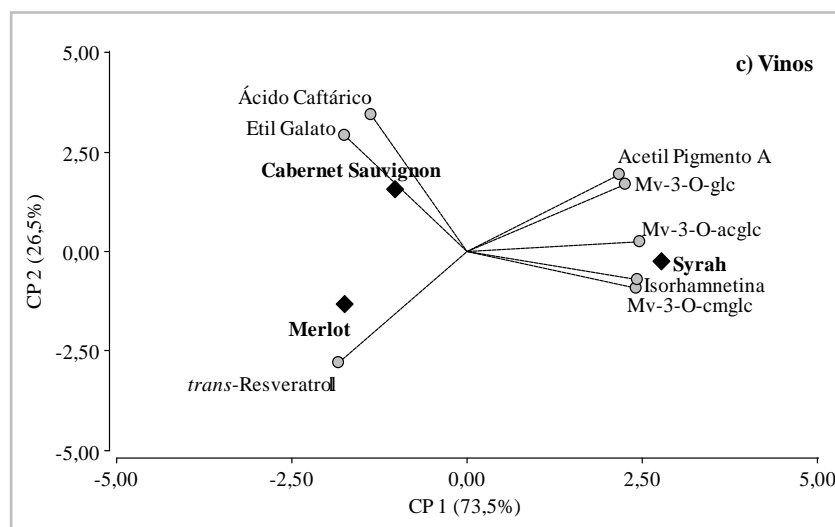
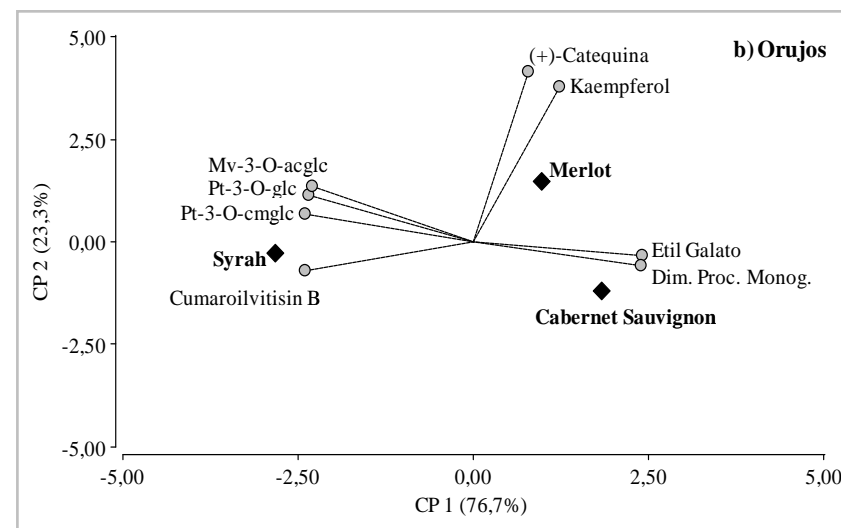
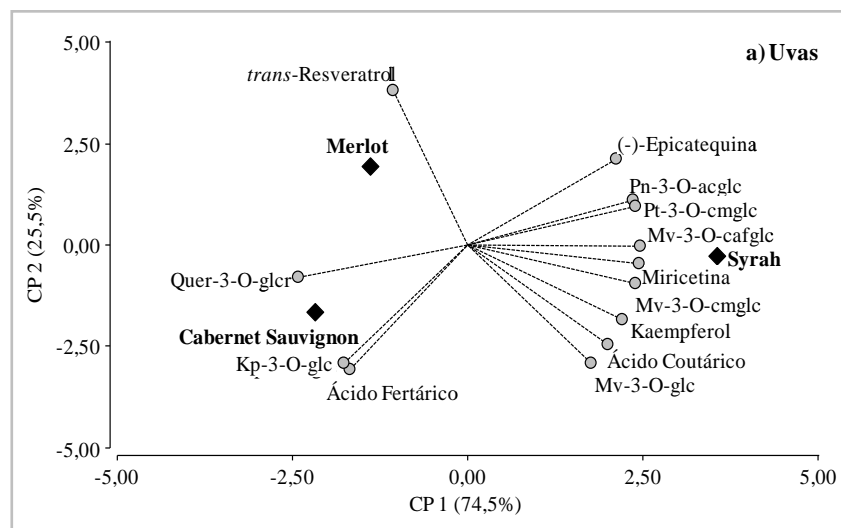


Figura 4.6. Biplots ilustrando la relación entre los compuestos más importantes para explicar la CA *in vivo* y las tres variedades tintas *V. vinifera* L. a) Uvas; b) Orujos; c) Vinos. Abreviaturas: Mv, malvidina; Pn, peonidina; Pt, petunidina; glc, glucósido; ac, acetil; cm, cumaroil; Quer, quercetina; Kp, kaempferol; Dim. Proc. Monog., dímero de procianidina monogalato.

En el caso de las uvas, el ARM mostró que de los 39 polifenoles cuantificados en estas muestras 13 fueron seleccionados para explicar la tasa de sobrevida, 19 para la explicación de la actividad de GPx y 21 para la de GR. El análisis de la magnitud de los β señaló a malvidina-3-O-cafeoilglucósido, petunidina-3-O-cumaroilglucósido, kaempferol y miricetina como los compuestos con la contribución positiva más alta para la tasa de sobrevida, mientras que quercetina-3-O-glucurónido y *trans*-resveratrol fueron los compuestos más importantes con contribución negativa a dicha propiedad (**Figura 4.5a**). Para las actividades de GPx y GR, el análisis de los β señaló a los mismos compuestos como los más importantes para ambas actividades enzimáticas: malvidina-3-O-glucósido, peonidina-3-O-acetilglucósido, malvidina-3-O-cumaroilglucósido, kaempferol-3-O-glucósido, (-)-epicatequina, ácido coutárico y ácido fertárico contribuyeron positivamente, mientras que quercetina-3-O-glucurónido y *trans*-resveratrol lo hicieron negativamente (**Figura 4.5a**). Al comparar el contenido de estos compuestos entre las variedades estudiadas (**Figura 4.6a; Tablas 2.4, 2.5 y 2.6, CAPÍTULO 2**), se observó que aquellos que mostraron la mayor contribución positiva a la tasa de sobrevida y a la actividad de las enzimas se encontraron en mayor concentración en la variedad Syrah, mientras que presentó el menor contenido de quercetina-3-O-glucurónido y *trans*-resveratrol. Por lo tanto, las diferencias cuantitativas de estos compuestos polifenólicos entre variedades permitirían explicar la mayor CA *in vivo* demostrada por las uvas Syrah (**Figuras 4.2a y 4.4a**). Por otra parte, es importante destacar que las uvas Merlot mostraron el mayor contenido de *trans*-resveratrol, lo cual podría estar explicando la menor inducción enzimática demostrada por la variedad (**Figura 4.4a**).

En el caso de los orujos, el ARM seleccionó 20, 22 y 21 polifenoles de los 36 cuantificados en estas muestras para la explicación de la tasa de sobrevida, actividad de GPx y de GR, respectivamente. El análisis de sus β señaló a los mismos compuestos como los factores más importantes para los tres parámetros. Petunidina-3-O-glucósido, malvidina-3-O-acetilglucósido, petunidina-3-O-cumaroilglucósido y cumaroilvitisin B fueron aquellos que demostraron la mayor contribución positiva, mientras que kaempferol, dímero de procianidina monogalato, (+)-catequina y etil galato fueron los que demostraron la mayor contribución negativa (**Figura 4.5b**). Nuevamente, al comparar el contenido de estos compuestos entre las variedades estudiadas (**Figura 4.6b; Tablas 2.4, 2.5 y 2.6, CAPÍTULO 2**), se observó que aquellos con la mayor contribución positiva a la CA de los orujos se encontraron en concentraciones más altas en la variedad Syrah en comparación a Merlot y Cabernet Sauvignon. Por el contrario, los compuestos con la mayor contribución negativa se

encontraron en mayores concentraciones en las variedades Merlot y Cabernet Sauvignon. Estos resultados permitirían explicar la mayor actividad de los orujos Syrah con respecto a Merlot y Cabernet Sauvignon (**Figuras 4.2b y 4.4b**).

Finalmente, cuando se estudiaron las muestras de vino, el procedimiento estadístico seleccionó 15, 20 y 18 compuestos de los 33 cuantificados para explicar la tasa de sobrevida, actividad de GPx y de GR, respectivamente. Los compuestos con la mayor contribución fueron los mismos para los tres parámetros. Malvidina-3-O-glucósido, malvidina-3-O-acetilglucósido, malvidina-3-O-cumaroilglucósido, acetil pigmento A e isorhamnetina mostraron la mayor contribución positiva, mientras que ácido caftárico, etil galato, y *trans*-resveratrol demostraron la mayor contribución negativa (**Figura 4.5c**). La comparación del contenido de estos compuestos entre variedades (**Figura 4.6c; Tablas 2.4, 2.5 y 2.6, CAPÍTULO 2**), demostró que la variedad Syrah presentó el mayor contenido de malvidina-3-O-glucósido, malvidina-3-O-acetilglucósido, malvidina-3-O-cumaroilglucósido, acetil pigmento A e isorhamnetina; por su parte, los vinos Merlot y Cabernet Sauvignon mostraron el mayor contenido de ácido caftárico, etil galato y *trans*-resveratrol. Estos resultados explicarían la mayor actividad de los vinos Syrah (**Figuras 4.2c y 4.4c**).

Los resultados hasta aquí obtenidos demuestran que la CA *in vivo* observada para cada muestra, depende del tipo y cantidad de compuesto polifenólico presente, y son estos dos factores los que finalmente determinan el comportamiento bioactivo de la variedad. Es importante destacar que los compuestos antocianos fueron señalados como los principales polifenoles asociados positivamente a esta CA en los tres tipos de muestra analizadas (uva, orujo y el vino), y de acuerdo con los resultados obtenidos en el **CAPÍTULO 2 (Tabla 2.4, Sección 2.2.3, y Figura 2.4, Sección 2.3.4)** de esta tesis, la variedad Syrah fue la que se caracterizó por el mayor contenido de este tipo de compuestos, lo que explicaría los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* (**Figuras 4.2 y 4.4**). En línea con este resultado, estudios previos han demostrado que la fracción de compuestos antocianos de diferentes bayas y del vino presenta la mayor protección, en comparación a otras fracciones fenólicas, contra el daño oxidativo en diferentes líneas celulares (Im *et al.*, 2013; Jiménez *et al.*, 2010). Por otro lado, la variedad Merlot mostró la inducción más baja de la actividad de GPx y GR luego de la exposición al H₂O₂, incluso en algunos casos estas actividades fueron iguales o menores en comparación a las células expuestas al H₂O₂ solamente (**Figuras 4.4**). De acuerdo con los resultados obtenidos en el **CAPÍTULO 2 (Tabla 2.6, Sección 2.3.3, y Figura 2.4, Sección 2.3.4)** de esta tesis, las uvas y los vinos de la variedad Merlot mostraron un perfil polifenólico

caracterizado por el mayor contenido en *trans*-resveratrol. Según el ARM, el aumento de la concentración de este compuesto estaría relacionado con una disminución en la actividad de GPx y GR (**Figuras 4.5a y 4.5c**). Estudios previos han demostrado que el *trans*-resveratrol puede ejercer efecto pro-oxidante o antioxidante dependiendo de la concentración en diferentes líneas celulares humanas bajo situación de estrés oxidativo inducido (Chen *et al.*, 2013). En nuestro estudio, los resultados observados con respecto a la modulación de la actividad de GPx y GR por Merlot estarían sugiriendo que altas concentraciones de este compuesto tienen efectos adversos, alterando la defensa antioxidante enzimática endógena. Por lo tanto, el potencial efecto antioxidante del *trans*-resveratrol depende de su dosificación (Chen *et al.*, 2013).

Adicionalmente a las diferencias de CA *in vivo* entre variedades, se observó que los extractos de uvas demostraron la mayor bioactividad a pesar de utilizar la menor concentración de PT para rescatar a las levaduras del daño oxidativo (**Sección 4.3.1.1**). De acuerdo a los resultados discutidos en el **CAPÍTULO 2** de esta tesis, el perfil polifenólico, desde la uva hasta la obtención del vino, sufre importantes cambios como consecuencia del proceso de vinificación, por lo que la mayor actividad biológica de las uvas como materia prima del proceso, sería explicada por su perfil polifenólico diferencial en comparación a los orujos y los vinos. De acuerdo a los resultados del ARM, kaempferol-3-O-glucósido y ácido fertárico fueron señalados como factores con contribución positiva a la CA *in vivo* de las uvas (**Figura 4.5a**). Ambos compuestos, fueron solamente cuantificados en la uva, probablemente debido a la hidrólisis ácida que sufren durante el proceso de vinificación, lo que conlleva a su no detección en orujos y vinos (**Tablas 2.5 y 2.6, CAPÍTULO 2**). Por otro lado, etil galato fue señalado por el ARM como un compuesto con contribución negativa a la CA (**Figura 4.5b y 4.5c**). Etil galato es un compuesto que se forma durante el proceso de fermentación mediante la esterificación de ácido gálico con etanol (**Sección 2.3.3.5, CAPÍTULO 2**), lo que explica su cuantificación en los orujos y los vinos, pero no se detecta en las uvas (**Tabla 2.6, CAPÍTULO 2**). Por lo tanto, estos resultados estarían indicando que los cambios en el perfil polifenólico de la uva como consecuencia del proceso de elaboración del vino, estarían afectando la CA del vino y el orujo.

4.3.3 Expresión del Proteoma Celular

Con el fin de avanzar sobre los mecanismos de acción biológica por los cuales los compuestos polifenólicos podrían ejercer su protección frente al estrés oxidativo se estudiaron

los cambios a nivel de proteoma celular en *S. cerevisiae*. Las proteínas se encuentran entre los productos mejor caracterizados para atenuar o reparar el daño causado por el estrés en *S. cerevisiae*. Su estudio ha evidenciado que la respuesta a nivel transcripcional es importante para la supervivencia celular y ha llevado a la descripción de varias vías de transducción de señales y factores de transcripción involucrados en esta respuesta (Farrugia & Balzan, 2012).

Para llevar a cabo estos ensayos se trabajó con las muestras de vino correspondientes a la variedad Syrah, ya que fue la variedad que demostró la mayor actividad *in vivo*. Se estudiaron los cambios en el proteoma celular de las levaduras:

- tratadas con H₂O₂ (para evaluar cambios producidos por el estrés oxidativo inducido),
- tratadas con vino (para evaluar los cambios que producen los polifenoles en situaciones normales),
- tratadas con vino + H₂O₂ (para evaluar qué proteínas estarían induciendo los polifenoles para atenuar el estrés oxidativo).

En la **Figura 4.7** se muestran las imágenes de los geles 2D obtenidos para cada tratamiento con los *spots* que demostraron expresión diferencial identificados por un número. En la **Tabla 4.1** se resumen las proteínas identificadas a partir de cada uno de estos *spots* y el tipo de expresión que demostraron.

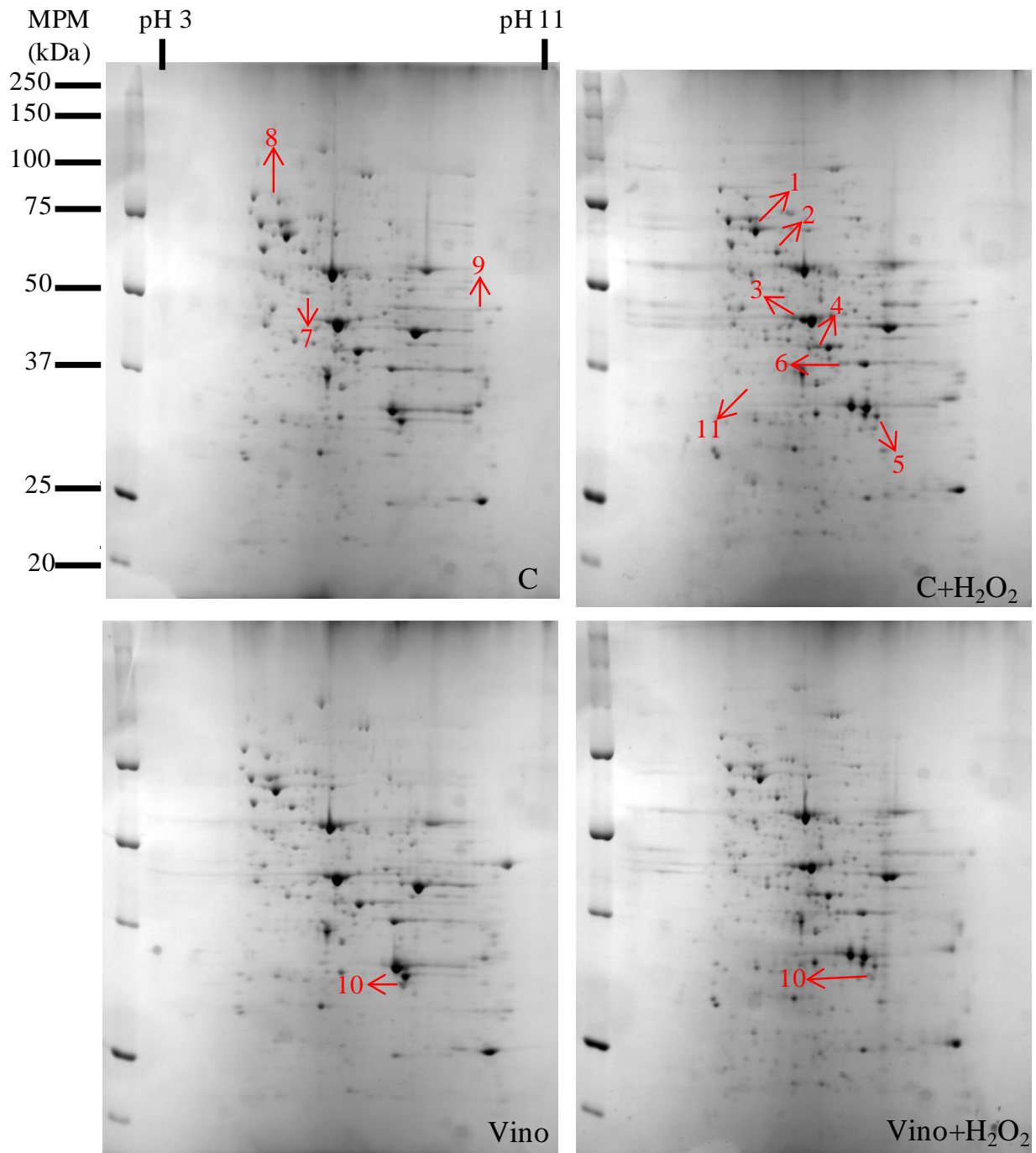


Figura 4.7. Geles 2D del proteoma celular de *S. cerevisiae* tratada con vino tinto en presencia/ausencia de H₂O₂. Abreviaturas: C, control con etanol; MPM, marcador de peso molecular.

Tabla 4.1. Proteínas identificadas con expresión diferencial en *S. cerevisiae* tratada con vino tinto, en presencia/ausencia de H₂O₂.

Tratamientos Comparados	N° Spot	Proteína Identificada	Función Biológica	Vía Metabólica Involucrada	Tipo de Expresión	N° Acceso al NCBI
C contra H₂O₂	1	Ssb1	Proteína de estrés por calor, familia Hsp70 ATPase	Respuesta a Estrés	Aumentada en H ₂ O ₂	gi 6319972
	2	Ald6p	Aldehído dehidrogenasa	Glucólisis	Aumentada en H ₂ O ₂	gi 323307016
	3	Eno1p	Enolasa (fosfopiruvato hidratasa)		Aumentada en H ₂ O ₂	gi 766973246
	4	Adh1p	Alcohol dehidrogenasa		Aumentada en H ₂ O ₂	gi 151945549
	5	Tdh2p	GAPDH (gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa)		Disminuida en H ₂ O ₂	gi 768902779
	6	Ilv5x	Acetohidroxi-acido-isomeroreductasa	Metabolismo de Aminoácidos	Aumentada en H ₂ O ₂	gi 957238
C contra Vino	7	Gdh1p	Glutamato dehidrogenasa	Metabolismo de Aminoácidos	Disminuida en Vino	gi 768484952
	8	Ade5,7	Fosforibosilamina-glicina ligasa	Metabolismo de Ácido Nucleico	Disminuida en Vino	gi 51013423
	9	Tef2	Factor de elongación de traducción EF-1 α	Síntesis de Proteínas (maquinaria de transcripción y traducción)	Disminuida en Vino	gi 6319594
	10	Rpl5p	Subunidad ribosomal 60S de la proteína L5		Aumentada en Vino	gi 323306976
C+H₂O₂ contra Vino+H₂O₂	11	Gcd11p	Factor de iniciación de traducción eIF2 γ	Síntesis de Proteínas (maquinaria de transcripción y traducción)	Disminuida en Vino+ H ₂ O ₂	gi 349577683
	10	Rpl5p	Subunidad ribosomal 60S de la proteína L5		Aumentada en Vino+ H ₂ O ₂	gi 323306976

Abreviaturas: C, control con etanol; NCBI, Centro Nacional para la Información Biotecnológica (“*National Center for Biotechnology Information*”).

4.3.3.1 Cambios en el proteoma celular inducidos por H₂O₂

En primer lugar se estudiaron los cambios que el estrés oxidativo inducido por el H₂O₂ produce sobre el proteoma de la levadura. En este sentido por comparación de los tratamientos control contra H₂O₂ (C contra H₂O₂), 6 proteínas con expresión diferencial lograron ser identificadas (**Tabla 4.1**). Se observó la sobre-expresión en la condición de estrés oxidativo de una proteína HSP (heat shock protein o proteína de estrés por calor) perteneciente a la familia de las Hsp70. Las HSP son un grupo de proteínas bien conocidas por pertenecer al sistema de defensa antioxidante intracelular y estar implicadas en la regulación de la homeostasis redox celular. Estas proteínas están involucradas en la degradación o reactivación de las proteínas dañadas por diferentes condiciones de estrés (Walker & Dijck, 2006). La sobre-expresión de este tipo de proteínas ha sido observada en trabajos previos bajo diferentes condiciones de estrés oxidativo inducido en la levadura, entre los que se mencionan estrés por H₂O₂, cobre (Cu²⁺) y menadione (Shenton & Grant, 2003; Shanmuganathan *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007).

De las enzimas involucradas en la vía glicolítica del metabolismo de carbohidratos se observó la sobre-expresión de Eno1p, Ald6p y Adh1p, mientras que la expresión de Tdh2p (GAPDH) fue disminuida (**Tabla 4.1**). A pesar de que el tratamiento del H₂O₂ produjo la sobre-expresión de muchas de las enzimas de la vía glicolítica, la reducción en los niveles de GAPDH, que probablemente se traducen en una baja actividad de dicha enzima, producirían la acumulación de su sustrato (gliceraldehido-3-fosfato). La acumulación de gliceraldehido-3-fosfato causaría una disminución de la velocidad y/o inhibición de la conversión de la glucosa en etanol. Esta disminución del metabolismo de carbohidratos por la vía glicolítica podría estar re-direccionando el metabolismo de la glucosa hacia la vía de las pentosa fosfato (PPP) (**Figura 4.8**). Estudios previos han propuesto que el bloqueo de la glucólisis podría ser beneficioso durante condiciones de estrés oxidativo, ya que daría lugar a un aumento del flujo de equivalentes de glucosa hacia la PPP conduciendo a la generación de NADPH (Shenton & Grant, 2003; Longo *et al.*, 2015) (**Figura 4.8**).

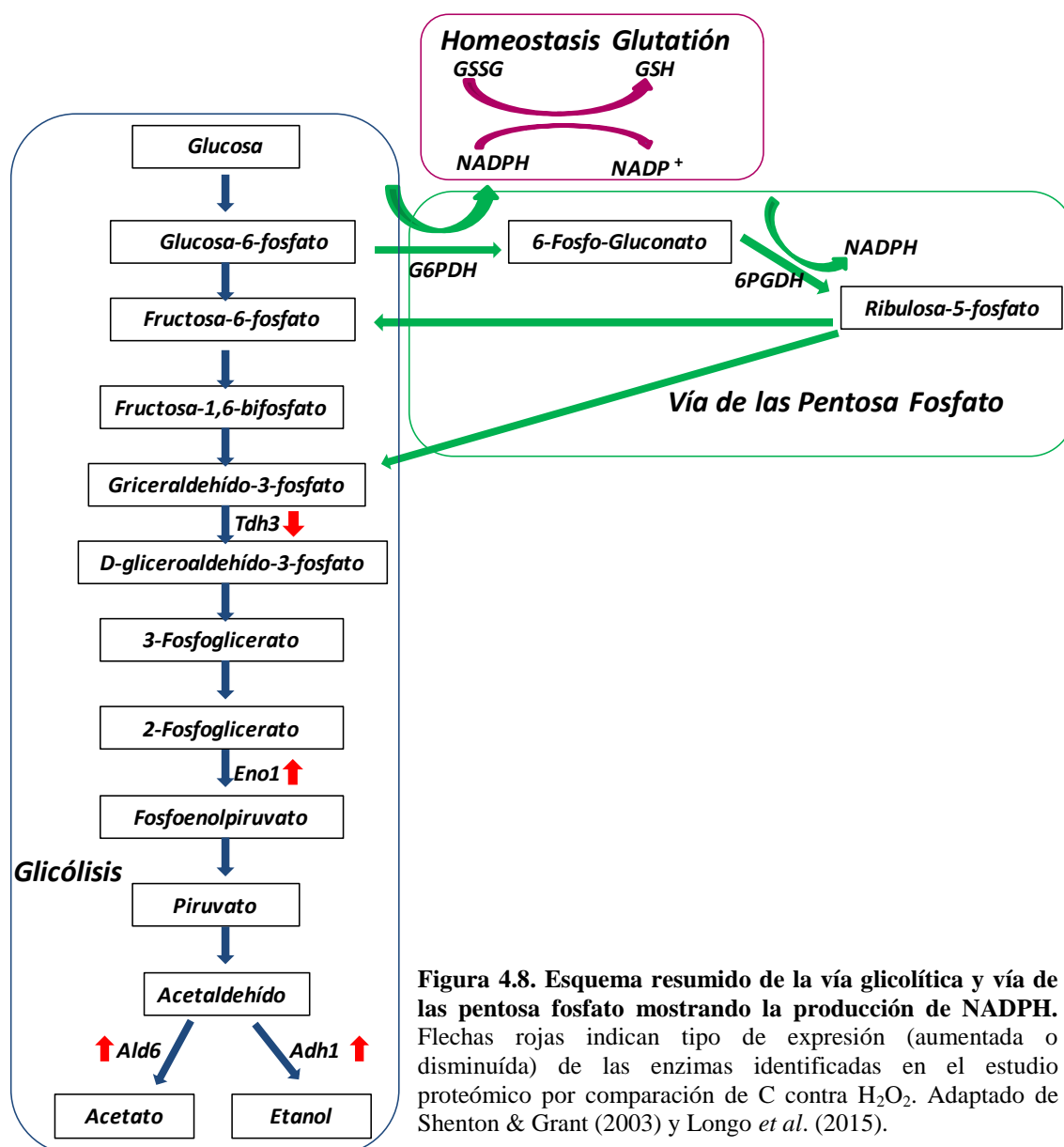


Figura 4.8. Esquema resumido de la vía glicolítica y vía de las pentosa fosfato mostrando la producción de NADPH. Flechas rojas indican tipo de expresión (aumentada o disminuída) de las enzimas identificadas en el estudio proteómico por comparación de C contra H₂O₂. Adaptado de Shenton & Grant (2003) y Longo *et al.* (2015).

Shenton & Grant (2003) observaron que el estrés oxidativo por H₂O₂ en *S. cerevisiae* inhibió la actividad de GAPDH, enolasa y alcohol dehidrogenasa, mientras que no afectó la actividad de aldehído dehidrogenasa. Reciente Longo *et al.* (2015) demostraron que el estrés oxidativo inducido por ácido acético en la levadura disminuyó la expresión de las enzimas de la vía glicolítica y esta disminución se correlacionó con menores niveles de varios sustratos intermediarios. Teniendo en cuenta los antecedentes y los resultados obtenidos en este estudio, la reducción en los niveles de GAPDH con el consecuente re-direccionamiento del metabolismo de la glucosa hacia la PPP podría ser otro de los mecanismos por el cual la levadura intenta sobrevivir al daño oxidativo generado por el H₂O₂.

Finalmente se observó la sobre-expresión de Ilv5x. Esta enzima además de catalizar la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina e isoleucina), está involucrada en la estabilización del ADN mitocondrial, proceso fundamental para mantener la actividad respiratoria de la mitocondria (Dumas *et al.*, 2001). De acuerdo a nuestros resultados, el daño oxidativo generado por H₂O₂ también conduciría a la levadura a incrementar la capacidad de mantenimiento del ADN mitocondrial para poder sobrevivir al daño oxidativo generado. Estudios previos han observado la sobre-expresión de dicha enzima en el proteoma mitocondrial de *S. cerevisiae* como una respuesta adaptativa de la levadura a condiciones de estrés endógeno (Mathy *et al.*, 2005).

4.3.3.2 Cambios en el proteoma celular inducidos por el vino tinto

En segundo lugar se estudiaron los cambios que los compuestos polifenólicos del vino producen sobre el proteoma de la levadura. Para ello se realizó la comparación de los tratamientos control contra vino (C contra vino) y 4 proteínas con expresión diferencial lograron identificarse (**Tabla 4.1**). En este sentido, se observó una disminución en la expresión de Gdh1p, Ade5,7, Tef2 cuando las células se trataron con el vino, mientras que Rpl5p fue incrementada.

Rpl5p es una proteína ribosomal constituyente de la subunidad 60S. La proteína pertenece a la familia L18P de proteínas ribosomales. Rpl5p se une al ARN ribosómico 5S para formar un complejo estable denominado partícula de ribonucleoproteína 5S (RNP), que es necesaria para el transporte del ARNr 5S citoplásmico asociado a ribosoma hacia el nucleolo para el ensamblaje con los ribosomas. La biogénesis ribosomal es esencial para el crecimiento, proliferación, diferenciación y desarrollo de las levaduras. Ha sido demostrado que una perturbación en cualquiera de los pasos en el proceso de la biogénesis ribosomal por estímulos intra o extracelulares puede conducir a un estrés ribosomal, teniendo como consecuencia el acúmulo de las proteínas ribosomales libres, las cuales ejercerían funciones celulares independientes de la ribosomal (Zhou *et al.*, 2015). Por ejemplo, Rpl5p es capaz de suprimir la proliferación tumoral, activar supresores de tumores (ej. P53) y al mismo tiempo inactivar algunas oncoproteínas (Dai & Lu, 2004). También ha sido señalado que estas proteínas pueden actuar como mediadores del sistema inmune, regulando los procesos inflamatorios (Zhou *et al.*, 2015). Es decir que el estrés ribosomal provocado posiblemente por los polifenoles del vino, llevaría a un aumento de la Rpl5p que en definitiva sería beneficioso, no por sus funciones ribosomales, sino por aquellas extra ribosomales.

Por otro lado, los polifenoles del vino estarían disminuyendo la expresión de Gdh1p, Ade5,7 y Tef2. Estas proteínas están involucradas en la maquinaria del metabolismo y biosíntesis de las biomoléculas (ADN, aminoácidos, proteínas). Resultados similares fueron encontrados por Cho *et al.* (2007) quienes observaron que los polifenoles del té verde disminuyen la expresión de varias proteínas involucradas en la vía metabólica de los aminoácidos en bacterias ejerciendo de este modo su efecto bactericida, es decir que estaría asociado a un efecto más del tipo pro-oxidante de los polifenoles.

Los cambios observados en relación a la expresión de proteínas en las levaduras expuestas a vino, sugerirían que los polifenoles estarían actuando como leves pro-oxidantes. El leve estrés causado por dichos compuestos estaría conduciendo a la célula a conservar recursos energéticos (evidenciado por la disminución en la expresión de proteínas involucradas en el metabolismo y biosíntesis de biomoléculas como Gdh1p, Ade5,7 y Tef2) para simultáneamente invertirlos en el aumento del sistema de defensa a estrés (evidenciado por el aumento en la expresión de Rpl5p) (Cho *et al.*, 2007). En adición a dicho mecanismo, este leve estrés también podría estar induciendo la actividad de las enzimas antioxidantes GPx y GR de acuerdo a lo observado en la **Figura 4.4c** de la **Sección 4.3.1.3**. Por lo tanto, teniendo en cuenta ambos mecanismos de acción (modulación de la síntesis de proteínas en respuesta a estrés e inducción de la actividad de enzimas antioxidantes), y sumado a los resultados obtenidos en los ensayos de sobrevivencia y oxidación intracelular, podría postularse que el leve efecto pro-oxidante de los polifenoles en situación normal, estaría promoviendo una respuesta que permitiría a la célula adaptarse adecuadamente y prevenir el daño en situaciones futuras de estrés oxidativo (como el generado por H₂O₂), actuando de esta manera como un agente hormético. La hormesis se define como el efecto beneficioso de bajos niveles de estrés, es decir la respuesta adaptativa de una célula a un estrés moderado, para luego hacerle frente a situaciones de estrés más severas (Mattson, 2008).

El efecto pro-oxidante de los polifenoles ha sido también observado por varios autores, concluyendo que este efecto genera en la célula una respuesta activando vías antioxidantes, que contribuirían al efecto beneficioso de la promoción de la salud (Bayliak *et al.*, 2015; Chedea *et al.*, 2010; Escoté *et al.*, 2012; Maeta *et al.*, 2007). Por ejemplo, se ha observado que el resveratrol a bajas concentraciones produce la acumulación de EROs en *S. cerevisiae* con la consecuente relocalización del factor de respuesta a estrés Yap1p en el núcleo y la inducción de la expresión de genes antioxidantes (TRX2, tiorredoxina 2; TRR1, tiorredoxina reductasa; y AHP1, alquilo hidroperóxido reductasa) (Escoté *et al.*, 2012). Estos

autores concluyeron que el resveratrol por acumulación hormética de EROs mejoró la sobrevivencia de la levadura expuesta a un oxidante fuerte como el H₂O₂.

Finalmente, se buscó comprender los cambios inducidos por los polifenoles del vino en situaciones de estrés oxidativo. Para ello, se estudiaron los cambios que se producen en el proteoma celular cuando las células son tratadas con H₂O₂ en comparación a aquellas tratadas con el vino + H₂O₂. De acuerdo a la **Tabla 4.1** lograron identificarse dos proteínas con expresión diferencial. De éstas, se observó que se mantuvo la sobre-expresión de la Rpl5p, por lo que estaría llevando a cabo su efecto beneficio por sus funciones extra ribosomales, como se detalló anteriormente. Por otro lado, se observó una disminución en la expresión de la Gcd11p (Factor de la iniciación de traducción eIF2 γ). Esta proteína forma parte del complejo eIF2 responsable de la iniciación de la traducción de proteínas, el cual está compuesto por tres subunidades (α , β y γ). De todos los factores de iniciación eucariotas, el más conocido es el eIF2, al que se le ha asignado el papel de control de la síntesis de proteínas. La subunidad γ se une directamente a Met-ARNt, permitiendo luego la unión del complejo eIF2 a la subunidad ribosomal 40S y luego al ARNm para iniciar la traducción. La disminución del eIF2 podría estar disminuyendo la expresión de proteínas en la levadura, situación que permitiría a la células conservar recursos y realizar una reconfiguración de la expresión génica para manejar efectivamente las condiciones de estrés (Wek *et al.*, 2006; Mascarenhas *et al.*, 2008). Similares resultados fueron observados por Villa-Cuesta *et al.* (2011) en células hepáticas cancerígenas expuestas a resveratrol. Estos autores observaron una disminución en la expresión de proteínas, asociado a modificaciones en el complejo eIF2. Cabe aclarar que al igual que nuestros resultados, esta disminución en la síntesis de proteínas no tuvo efecto alguno sobre la viabilidad celular. En otros trabajos se observó que genisteína también disminuyó la expresión de la eIF2 γ en células cancerígenas de endometrio, con la consecuente disminución en la síntesis proteica (Konstantakopoulos *et al.*, 2007).

Los resultados en su conjunto sugieren que una importante reconfiguración de la expresión génica es producida por los polifenoles del vino sobre la levadura, situación que le permitiría adaptarse a futuras condiciones de estrés severo. Específicamente, se propone que estos compuestos podrían estar ejerciendo un efecto hormético, es decir actuando como leves pro-oxidantes induciendo a la célula a activar su sistema de defensa probablemente a nivel de traducción, o síntesis de proteínas en respuesta a estrés, e induciendo la actividad de enzimas antioxidantes, con el fin de estar preparada para resistir situaciones futuras de estrés más severas. En línea con esta hipótesis, Jiménez *et al.* (2010) observaron que las fracciones ricas

en antocianos purificadas del vino indujeron la acumulación en el núcleo de los reguladores transcripcionales de respuesta a estrés oxidativo Yap1p y Msn2p. Los autores concluyeron que esta activación transcripcional fue la responsable de la actividad biológica demostrada por dichas fracciones frente al daño oxidativo en *S. cerevisiae*. Adicionalmente observaron que deplfinidina-3-O-glucósido y petunidina-3-O-glucósido ejercieron su actividad biológica, pero en este caso como consecuencia de la activación de los reguladores de respuesta a estrés Msn2p y Msn4p, remarcando la importancia de las interacciones sinérgicas y/o antagónicas entre los diferentes compuestos polifenólicos presentes en las fracciones. Debido a los resultados obtenidos en esta parte de la tesis y teniendo en cuenta el antecedente de Jiménez *et al.* (2010), es que la realización de más estudios a futuro son necesarios para confirmar la hipótesis del efecto hormético de los polifenoles del vino, con especial influencia de los antocianos, y en consecuencia, la inducción de los factores de transcripción involucrados en la expresión de genes que codifican para proteínas antioxidantes.

4.3.4 Evaluación de la capacidad antioxidante en células HepG2

Los ensayos de CA con células HepG2 se plantearon con el objetivo de avanzar en los estudios sobre el efecto biológico del tipo de muestras estudiadas en esta tesis. Adicionalmente, se buscó comparar los resultados obtenidos mediante el empleo de *S. cerevisiae* como modelo biológico de esta tesis con una línea celular humana. Se seleccionaron las células HepG2 debido a que ofrecen un modelo del hígado, el principal sitio de metabolismo y eliminación de xenobióticos en el hombre (Bornsek *et al.*, 2012). Los estudios de CA con dichas células se llevaron a cabo solamente con las muestras de vino debido a los prolongados tiempos necesarios para el desarrollo de los ensayos.

Mediante el ensayo del MTT, se estudió la sobrevivencia de las células como una medida de la CA que tienen las tres variedades de vino *V. vinifera* L. cv. Syrah, Merlot y Cabernet Sauvignon para atenuar el estrés oxidativo inducido por H₂O₂. La **Figura 4.9** muestra los resultados obtenidos para los tres vinos tintos varietales estudiados.

Se puede observar que el tratamiento de las células con las diferentes variedades de vinos en estudio no produce efecto citotóxico alguno en comparación a las células del control negativo (C). Por otro lado, la exposición de las células al H₂O₂ como agente pro-oxidante produce muerte celular siendo solamente el 50 % de las células capaces de resistir el daño oxidativo inducido. Sin embargo, el previo tratamiento de estas células con las muestras de vino logra atenuar el daño celular producido por el H₂O₂. Específicamente, el vino Syrah

incrementó la tasa de supervivencia en un 19 % en comparación a las células con H₂O₂. La variedad Merlot mostró un aumento del 12 %, y el varietal Cabernet Sauvignon del 15 %. De acuerdo a los resultados obtenidos y como se puede observar en la figura, el vino Syrah fue el que logró en mayor medida y con la mayor significancia la protección de las células frente al daño oxidativo inducido.

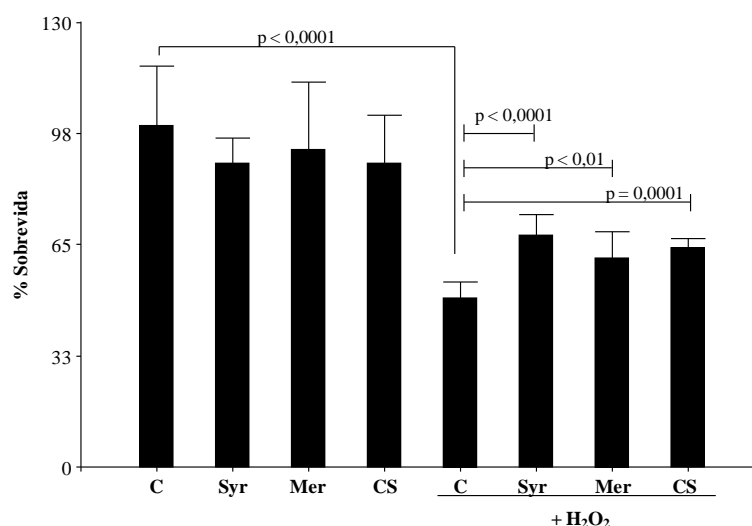


Figura 4.9. Porcentaje de supervivencia de células HepG2 tratadas con las diferentes variedades de vino, en presencia/ausencia de H₂O₂. Abreviaturas: C, control negativo; Syr, Syrah; Mer, Merlot; CS, Cabernet Sauvignon.

Los resultados obtenidos mediante este estudio constituyen una evidencia adicional a lo observado en las secciones anteriores sobre el poder bioactivo que tiene el vino tinto, siendo la variedad Syrah la que posee el mayor efecto para proteger a las células del estrés oxidativo. Asimismo, se pudo observar que los resultados obtenidos mediante este estudio fueron comparables a los logrados mediante el empleo de *S. cerevisiae* como modelo biológico, lo que permitiría reforzar los antecedentes sobre el empleo de la levadura como un modelo biológico sencillo de manipular para especular sobre el efecto biológico de extractos naturales ricos en polifenoles y alimentos funcionales en líneas celulares humanas.

4.4 Conclusiones Parciales

En esta tercera parte de la tesis se estudió la capacidad antioxidante (CA) *in vivo* de la uva, el orujo y el vino de tres variedades tintas *V. vinifera* L. cv. Syrah, Merlot y Cabernet Sauvignon cultivadas en Argentina.

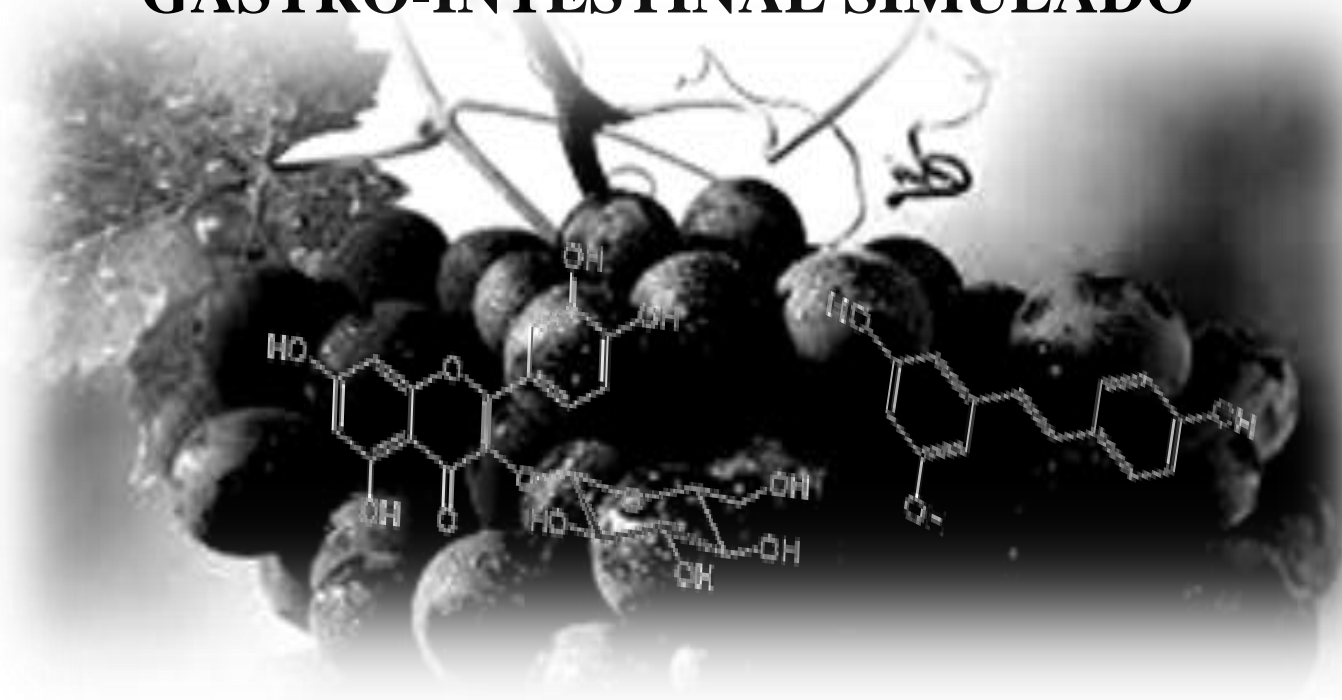
Todas las muestras fueron capaces de rescatar a la levadura del estrés oxidativo inducido, sin embargo se observaron diferencias en la CA entre variedades y entre tipo de muestras. La utilización de técnicas de estadística multivariada, como el ACC y ARM, demostró que el perfil polifenólico condiciona esta CA, permitiendo de esta manera explicar las diferencias observadas en dicha propiedad. La variedad Syrah presentó la mayor actividad biológica como consecuencia de su perfil polifenólico caracterizado por el mayor contenido en compuestos antocianos, mientras que el mayor contenido de *trans*-resveratrol en la uva y el vino Merlot contribuyó a su menor actividad. Por otra parte, los cambios en el perfil polifenólico desde la uva al vino, como consecuencia de la vinificación, afectaron la CA de las muestras. En este sentido, las uvas demostraron la mayor CA consecuencia de su perfil fenólico diferenciado por el mayor contenido de kaempferol-3-O-glucósido y ácido fértrico, en comparación al vino y el orujo, que demostraron el mayor contenido de etil galato. Es importante destacar que la CA de los orujos fue comparable a la de los vinos, resultado que en conjunto a los obtenidos en los **CAPÍTULOS 2 y 3**, impulsaría a la recuperación de este residuo agroindustrial como una fuente rica de compuestos bioactivos.

Uno de los mecanismos por los cuales los polifenoles ejercerían su acción biológica, es el incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes GPx y GR con una consecuente disminución de la oxidación intracelular.

Se observó que la levadura sobrevive al estrés generado por el H₂O₂ posiblemente re-direccionando el metabolismo de la glucosa hacia la PPP, e induciendo la expresión de proteínas involucradas en la reparación de moléculas dañadas y en la estabilización del ADN mitocondrial. Asimismo, los estudios proteómicos demostraron que los polifenoles del vino modificarían la expresión de ciertas proteínas. Se postula que la actividad biológica observada sería consecuencia del efecto hormético de los polifenoles presentes en las muestras sobre la célula, lo que les implicaría actuar como leves agentes pro-oxidantes generando en la célula una respuesta adaptativa, probablemente activando la síntesis de proteínas en respuesta a estrés e induciendo la actividad de enzimas antioxidantes, que la prepararía para hacerle frente a futuras situaciones de estrés severo.

CAPÍTULO 5

BIODISPONIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS ANTIOXIDANTES DE LA UVA Y EL VINO TINTO LUEGO DE UN PROCESO DE DIGESTIÓN GASTRO-INTESTINAL SIMULADO



5.1 Antecedentes

Los compuesto 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; Manach *et al.*, 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). Este concepto es muy importante, ya que los compuestos fenólicos más abundantes que ingerimos por medio de los alimentos no siempre son los más activos en el organismo, ya sea porque tienen una menor actividad intrínseca, su absorción en el intestino es baja, son altamente metabolizados o se excretan rápidamente (Manach *et al.*, 2004; Manach *et al.*, 2005; Srinivasan, 2001). Algunos de estos compuestos 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 son absorbidos 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 pueden volver al duodeno a través de la circulación enterohepática, prolongando su presencia en el organismo, o bien, pueden ser eliminados por orina (Manach *et al.*, 2004).

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). Para entender la biodisponibilidad de un compuesto en primer lugar debemos estudiar su bioaccesibilidad. La bioaccesibilidad se define 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). 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.

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. El ensayo imita las condiciones físico-químicas (pH, temperatura, tiempos, agitación y enzimas) a las que son sometidos los alimentos luego de ser ingeridos por el hombre. Se caracteriza por ser un ensayo rápido, simple, seguro y más económico en comparación a los ensayos con sistemas *in vivo*. 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).

En bibliografía se pueden encontrar diferentes estudios sobre el efecto de la digestión gastro-intestinal sobre los compuestos polifenólicos del vino tinto. Se ha observado que este proceso causa una disminución de los polifenoles totales (Gumienna *et al.*, 2011), con importantes cambios cuantitativos en el perfil (Martínez-Ortega *et al.*, 2001). Algunos autores han estudiado el efecto de la digestión gastrointestinal sobre los ácidos fenólicos observando la descomposición del ácido clorogénico, llevando a la liberación de ácido cafeico y la formación de otros derivados de ácidos fenólicos con alta actividad antioxidante (Gumienna *et al.*, 2011). Por otro lado, estudios sobre la estabilidad de los antocianos han demostrado que estos compuestos bajo condiciones gástricas son estables, sin embargo, luego de la digestión en el intestino sufren una importante descomposición ya que debido a su estructura química son inestables a las condiciones básicas encontradas en esa zona del tracto digestivo (McDougall *et al.*, 2005). En cuanto a los estudios sobre los compuestos polifenólicos de la uva, se ha observado que las proantocianidinas o flavanoles poliméricos son degradados a lo largo del proceso digestivo (Fernández & Labra, 2013). Sin embargo, la mayoría de estos estudios han sido realizados sobre los extractos polifenólicos de la uva por lo que no reflejan las condiciones reales bajo las cuales el hombre ingiere este alimento y es sometido al proceso digestivo. A diferencia del vino, la uva es un alimento sólido en donde la biodisponibilidad de sus compuestos polifenólicos depende en primer lugar de su liberación desde la matriz sólida del alimento a lo largo del tracto digestivo. A nuestro entendimiento, solamente un trabajo de investigación ha publicado la biodisponibilidad de los polifenoles desde la uva entera como alimento (Tagliazzuchi *et al.*, 2010). A pesar de que todos estos antecedentes realizan un aporte interesante al conocimiento de la estabilidad y biodisponibilidad de los polifenoles de la uva y el vino, ninguno de ellos evalúa los cambios del completo perfil polifenólico de estos

alimentos a lo largo del proceso digestivo, ni tampoco involucran una etapa final de diálisis que permitiría determinar los compuestos que potencialmente serían absorbidos a través de la membrana del intestino.

Por lo tanto, estos cambios en la estabilidad de los compuestos polifenólicos sugieren que el proceso digestivo sería un factor importante en la capacidad antioxidante finalmente ejercida por la uva (Tagliazzuchi *et al.*, 2010) y el vino tinto (Gumienna *et al.*, 2011). En esta parte de la tesis se busca avanzar sobre el conocimiento de la estabilidad y bioaccesibilidad de los compuestos polifenólicos de la uva y el vino tinto a través de un modelo experimental que simula la digestión gastro-intestinal humana, incluyendo una etapa final de diálisis para simular la absorción a través del epitelio intestinal. Esta última etapa permitiría identificar aquellos compuestos potencialmente biodisponibles para ejercer su acción antioxidante en el organismo.

5.2 Materiales y Métodos

5.2.1 Estándares y Reactivos

Para el ensayo de digestión gastro-intestinal *in vitro*, las enzimas pepsina (P-7000, 632 unidades/ mg de sólido), de mucosa estomacal de cerdo, y pancreatina (P-1750), de páncreas de cerdo, y el extracto de bilis (B-8631) de cerdo fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina). El agua utilizada para todas las determinaciones fue ultra pura ($< 5 \mu\text{g/L}$ TOC y conductividad de $0,055 \mu\text{S/cm}$) obtenida de un sistema de purificación Arium 61316-RO acoplado a un sistema Arium 611-UV (Sartorius, Alemania).

5.2.2 Muestras de estudio

Las muestras estudiadas en este capítulo fueron la uva y el vino de la variedad Syrah.

5.2.3 Ensayo de digestión gastro-intestinal *in vitro*

La evaluación de la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos polifenólicos presentes en alimentos como la uva y el vino, se realizó mediante un ensayo que simula el proceso de digestión gastro-intestinal.

La metodología empleada para llevar a cabo el ensayo se basó en los trabajos publicados por Hu *et al.* (2013), McDougall *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 Syrah) se procesaron por triplicado y cada una de estas réplicas fue muestreada al final de cada etapa del ensayo.

1° Digestión Bucal. Esta etapa se realizó utilizando saliva humana ($n = 2$) recolectada según Hu *et al.* (2013). Un gramo de uva (peso fresco del alimento) o 2 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 μL 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 agregaron 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 NaHCO_3 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 55 mL/ g de uva digerida o 15 mL/ mL de vino digerido de una solución de NaHCO_3 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 Syrah, 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 **Colon Viable** y **Biodisponible**). La muestra Colon Viable está constituida por el homogenato presente en el interior de la membrana de diálisis, mientras que la muestra Biodisponible corresponde a la solución presente fuera de la membrana de diálisis.

Las submuestras Boca, Gástrico y Colon Viable recolectadas se centrifugaron a 13.000 x g durante 10 min, y las submuestras Colon Viable y Biodisponible se acidificaron con ácido fórmico hasta pH = 2, para neutralizar el NaHCO_3 . 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.

5.2.3.1 Determinación de Compuestos Polifenólicos

El contenido de PT y el perfil fenólico de todas las muestras recolectadas a lo largo del ensayo de digestión gastro-intestinal *in vitro* se determinó siguiendo la metodología descrita

en la **Sección 2.2.4** del **CAPÍTULO 2** de esta tesis. Los resultados obtenidos se compararon con los de las respectivas muestras sin digerir (extracto de uva y vino Syrah).

5.2.3.2 Determinación de la Capacidad Antioxidante *in vitro*

La CA *in vitro* evaluada por los ensayos FRAP, ABTS y DPPH de todas las submuestras recolectadas a lo largo del ensayo de digestión gastro-intestinal *in vitro* se determinó siguiendo la metodología descrita en la **Sección 3.2.3** del **CAPÍTULO 3** de esta tesis. Los resultados obtenidos se compararon con los de las respectivas muestras sin digerir (extracto de uva y vino Syrah).

5.2.4 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).

5.2.4.1 Estadística Descriptiva

De acuerdo a la **Sección 2.2.5.1** del **CAPÍTULO 2**, los valores obtenidos en las diferentes determinaciones analíticas de este capítulo son expresados como la media \pm desviación estándar.

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

De acuerdo a la **Sección 2.2.5.2** del **CAPÍTULO 2**, el ANOVA se aplicó a los valores obtenidos en los ensayos de compuestos polifenólicos y CA a fin de evaluar la variación a lo largo del proceso de digestión. 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.

5.3 Descripción de los resultados y discusión

Para los ensayos de digestión gástrica *in vitro* se utilizaron las muestras de vino y uva de la variedad Syrah, ya que fue la que demostró la mayor actividad antioxidante en los ensayos *in vivo*. 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.

5.3.1 Bioaccesibilidad y Biodisponibilidad de polifenoles a lo largo de la digestión gastro-intestinal

El efecto de la digestión gastrointestinal sobre el perfil de polifenoles y la capacidad antioxidante de la uva y del vino, se estudió en 3 etapas: la primera corresponde al alimento luego de su digestión en la boca (submuestra Boca), la segunda luego de su digestión en el estómago (submuestra Gástrico), y la última luego de su digestión y absorción en el intestino (submuestra Colon Viable y Biodisponible). La submuestra denominada Biodisponible representa a la fracción de polifenoles que difundiría, a través del epitelio intestinal, al torrente sanguíneo y estaría disponible para llegar al órgano o tejido donde ejercería su acción antioxidante, mientras que la submuestra Colon Viable estaría representando a los polifenoles que pasarían al colon ejerciendo su acción posiblemente a nivel de microflora colónica. A cada muestra se le analizó el perfil de polifenoles por HPLC-DAD-MS/MS y la actividad antioxidante por métodos *in vitro*.

En la **Figura 5.1** se muestran los cambios en el contenido de polifenoles totales (PT) y de los compuestos polifenólicos agrupados por familias a lo largo de la digestión gastro-intestinal simulada de la uva.

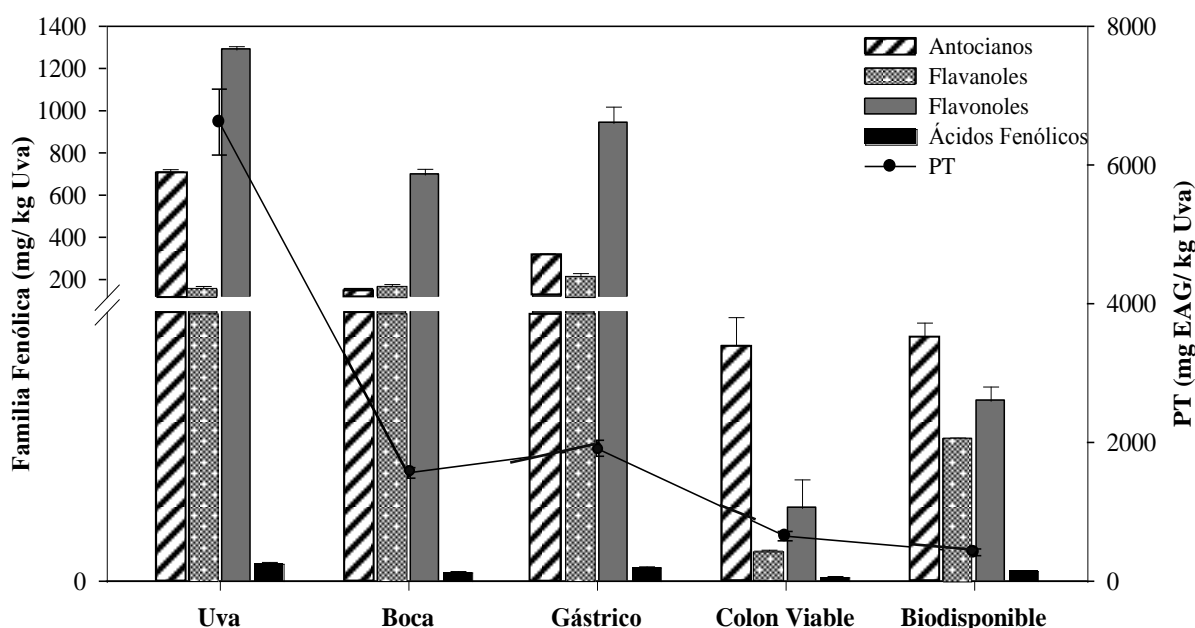


Figura 5.1. Cambios en los polifenoles totales (PT) y en las familias de compuestos polifenólicos a lo largo de la digestión gastro-intestinal *in vitro* de la uva tinta. Resultados expresados en base al peso fresco de la uva.

Como puede observarse en la **Figura 5.1**, luego de la masticación solo el 24% de los PT de la uva se encuentran bioaccesibles, es decir han sido extraídos de la matriz del alimento, en comparación al extracto metanólico de la uva. El análisis de cada una de las familias de polifenoles demostró que el proceso de masticación extrajo el 100 % de los flavanoles, mientras que solo el 54 % de flavonoles, un 52 % de los ácidos fenólicos y un 22 % de los antocianos se hicieron bioaccesibles. No se detectó *trans*-resveratrol (**Tabla 5.1**), perteneciente a la familia de estilbenos, luego de este proceso. Algunos autores han demostrado que durante la masticación se produce una interacción entre el *trans*-resveratrol y la α -amilasa, principal enzima salival (Xiao *et al.*, 2011). Esta interacción podría estar enmascarando su detección a lo largo del proceso digestivo simulado según lo publicado por Laurent *et al.* (2007). Solamente un trabajo fue encontrado en donde analizan la etapa de digestión en la boca (Tagliacruzchi *et al.*, 2010), y nuestros resultados fueron comparables a los observados por estos autores. Ellos evaluaron la bioaccesibilidad de los polifenoles de la uva tinta de mesa, encontrando que luego de la masticación solo el 49 % de los PT se hizo bioaccesible en comparación a la extracción química de la uva. Por espectrofotometría, observaron que esta etapa del proceso extrajo solo el 27 % de los flavonoides de la uva y el 19 % de los compuestos antocianos.

Seguido a la etapa de masticación, la digestión gástrica incrementó ($p < 0,05$) la bioaccesibilidad de los polifenoles hasta un 29 % con respecto al extracto de uva. Esto

sugiere, que durante la incubación con las enzimas gástricas los polifenoles siguen siendo extraídos desde la matriz del alimento. Asimismo, se observó que todas las familias de polifenoles incrementaron significativamente ($p < 0,05$) su contenido en comparación a la digestión en la boca. De esta manera, el 45 % del total de los antocianos de la uva, el 73 % de los flavonoles, y el 80 % de los ácidos fenólicos se hizo bioaccesible luego de la digestión gástrica. Particularmente, se observó que el incremento (38 %) de los flavanoles luego de esta etapa del ensayo dio lugar a un contenido que superó al encontrado inicialmente en la uva. Fernández & Labra (2013) observaron que las proantocianidinas, o flavanoles poliméricos, del extracto de piel de uvas tintas son hidrolizadas a sus unidades monoméricas luego de la etapa simulada de digestión gástrica como consecuencia de las condiciones fuertemente ácidas a las que son sometidas en dicha etapa. Por lo tanto, el elevado contenido de flavanoles observado en esta tesis luego de la digestión gástrica podría ser una consecuencia de la hidrólisis de sus precursores poliméricos que no pudieron ser detectados bajo nuestro método de análisis inicialmente en la uva, pero que fue evidenciada por el incremento observado por ejemplo en el monómero de (-)-epicatequina (**Tabla 5.1**). Los resultados observados en esta etapa del proceso son comparables a los descritos por Tagliazucchi *et al.*, (2010). Estos autores encontraron que luego de la digestión gástrica el 60 % de los PT de la uva tinta de mesa fueron bioaccesibles en comparación a la extracción química, observando que esta etapa del proceso extrajo un 48 % de los flavonoides y un 36 % de los compuestos antocianos.

Los resultados obtenidos hasta este momento demuestran 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 extraer los compuestos polifenólicos, aumentando la bioaccesibilidad de los mismos para su potencial beneficio sobre el organismo. Sin embargo, finalizada la etapa de digestión en el intestino, se observó una disminución significativa en el contenido de PT con una consecuente disminución en todas las familias de polifenoles ($p < 0,05$). En comparación a la digestión gástrica, el 56 % de los PT fue degradado bajo las condiciones de digestión en el intestino. La degradación de los polifenoles durante la digestión intestinal ha sido previamente observada por otros autores (Celep *et al.*, 2015; Cilla *et al.*, 2009; Podsedek *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. Solo el 10 % de los PT de la uva se encontraron en la fracción colon

viable (es decir que se encuentran en el intestino), y un 6 % en la fracción de polifenoles biodisponibles (es decir aquellos que pasaron la membrana de diálisis).

Como puede observarse en la **Tabla 5.1**, de los 33 compuestos que inicialmente se cuantificaron en la uva, solo 15 fueron capaces de atravesar la membrana de diálisis, representando entonces la fracción de compuestos biodisponibles. Entre ellos, los más abundantes fueron los flavanoles monoméricos (+)-catequina y (-)-epicatequina con porcentajes de recuperación (% R) del 88 % y 63 %, respectivamente, y los antocianos peonidina-3-O-glucósido, con un % R del 26 %, petunidina-3-O-acetilglucósido, % R del 58 %, y peonidina-3-O-acetilglucósido, % R del 57 %. En cuanto a la fracción colon viable, (**Tabla 5.1**) solo 15 compuestos fueron recuperados. Entre éstos, los más abundantes fueron los antocianos delphinifina-3-O-glucósido, peonidina-3-O-glucósido y peonidina-3-O-acetilglucósido con % R del 44 %, 26 % y 53 %, respectivamente.

Tabla 5.1. Contenido (mg/ kg peso fresco de uva) de compuestos polifenólicos individuales en la uva y en las distintas etapas de digestión de dicho alimento. % de Recuperación (%R) con respecto a la uva.

Compuesto	Uva	Boca	Gástrico	Colon Viable (%R)	Biodisponible (%R)
Dímero de Procianidina	5,62 ± 0,58	6,72 ± 0,56 b	7,88 ± 1,19 b	<LC a	<LD a
Dim. Proc. Monogalato	1,46 ± 0,37	0,70 ± 0,06 b	0,60 ± 0,21 b	<LD a	<LD a
(+)-Catequina	25,57 ± 4,76	79,87 ± 19,41 b	83,24 ± 3,04 b	4,78 ± 0,09 a (19)	22,41 ± 0,24 a (88)
(-)-Epicatequina	31,49 ± 7,32	76,4 ± 4,63 b	119,64 ± 19,11 c	4,01 ± 0,60 a (13)	19,82 ± 0,72 a (63)
(-)-Epicatequin-3-O-galato	88,35 ± 12,91	1,95 ± 0,93	<LC	<LD	<LD
Ácido Gálico	5,3 ± 0,55	0,48 ± 0,06 b	0,59 ± 0,06 c	<LC a	<LD a
Ácido Fertárico	<LD	2,29 ± 0,40 b	3,66 ± 0,40 c	1,31 ± 0,37 a	3,19 ± 0,11 c
<i>trans</i> -Resveratrol	0,60 ± 0,14	<LD	<LD	<LD	<LD
Miricetina-3-O-glc	46,65 ± 4,24	15,96 ± 0,55 b	23,82 ± 1,43 c	<LD a	<LD a
Astilbina	5,24 ± 0,49	6,51 ± 1,55 b	8,35 ± 0,55 c	<LD a	<LD a
Laricitrina-3-O-glc	36,57 ± 8,40	18,17 ± 1,98 b	20,75 ± 3,50 b	<LC a	<LC a
Quercetina-3-O-glcr	37,30 ± 6,46	36,78 ± 0,47 c	29,65 ± 4,46 b	3,63 ± 1,63 a (10)	6,79 ± 1,05 a (18)
Isoquercetina	494,36 ± 47,34	381,93 ± 13,13 b	506,74 ± 51,73 c	7,94 ± 2,96 a (2)	17,19 ± 9,06 a (4)
Kaempferol-3-O-glc	61,66 ± 6,62	19,07 ± 0,32 b	26,11 ± 0,81 c	3,39 ± 1,52 a (6)	12,04 ± 7,06 b (20)
Siringetina-3-O-glc	183,25 ± 15,25	28,78 ± 3,15 b	30,36 ± 3,58 b	2,15 ± 0,58 a (1)	3,66 ± 0,18 a (2)
Isorhamnetina-3-O-glc	417,07 ± 6,92	193,59 ± 16,09 b	299,61 ± 25,95 c	4,79 ± 1,74 a (1)	14,01 ± 3,03 a (3)
Miricetina	0,86 ± 0,06	<LD	<LD	<LD	<LD
Quercetina	4,38 ± 0,41	<LD	<LC	<LD	<LD
Kaempferol	0,84 ± 0,01	<LD	<LD	<LD	<LD
Siringetina	1,45 ± 0,25	<LD	<LD	<LD	<LD
Isorhamnetin a	3,41 ± 0,26	<LD	<LD	<LD	<LD
Delfinidina-3-O-glc	4,22 ± 1,14	1,66 ± 0,16 b	3,43 ± 0,35 c	1,87 ± 0,41 b (44)	<LC a
Cianidina-3-O-glc	17,17 ± 11,42	0,47 ± 0,17 b	<LD a	1,21 ± 0,09 c (7)	<LD a
Petunidina-3-O-glc	13,25 ± 1,92	4,39 ± 0,09 b	7,32 ± 0,65 c	0,83 ± 0,30 a (6)	1,29 ± 0,22 a (10)
Peonidina-3-O-glc	49,81 ± 5,83	8,76 ± 1,13	15,73 ± 0,23	12,75 ± 0,10 (26)	12,78 ± 6,05 (26)
Malvidina-3-O-glc	334,63 ± 22,53	105,18 ± 1,28 b	185,69 ± 1,50 c	30,75 ± 6,15 a (9)	31,45 ± 3,81 a (9)
Petunidina-3-O-acglc	2,51 ± 0,40	1,03 ± 0,04 b	1,67 ± 0,19 c	<LC a	1,46 ± 0,16 c (58)
Malvidina-3-O-acglc	166,35 ± 15,79	29,85 ± 0,61 b	93,76 ± 3,90 c	15,19 ± 1,97 a (9)	14,57 ± 0,90 a (9)
Peonidina-3-O-acglc	11,89 ± 0,66	5,56 ± 1,00 a	11,9 ± 0,72 b	6,34 ± 0,27 a (53)	6,73 ± 3,41 a (57)
Malvidina-3-O-cafglc	4,43 ± 0,36	<LD	<LD	<LD	<LD
Delfinidina-3-O-cmglc	1,87 ± 0,05	<LD	<LD	<LD	<LD
Petunidina-3-O-cmglc	5,32 ± 0,46	<LD	<LD	<LD	<LD
Malvidina-3-O-cmglc	86,47 ± 5,30	<LC c	<LC c	0,86 ± 0,07 b (1)	2,53 ± 0,52 c (3)
Peonidina-3-O-cmglc	10,96 ± 0,71	<LC	<LC	<LC	1,5 ± 0,50 (14)

Abreviaturas: glc, glucósido; glcr, glucurónido; ac, acetyl; caf, cafeoil; cm, cumaroil; < LD, menor al límite de detección; < LC, menor al límite de cuantificación. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre etapas del proceso de digestión (boca, gástrico, colon viable y biodisponible).

Por otro lado también se analizaron los cambios a lo largo de la digestión simulada del vino tinto. La **Figura 5.2** se muestran los cambios en el contenido de PT y de los compuestos polifenólicos agrupados por familias en cada etapa del proceso simulado.

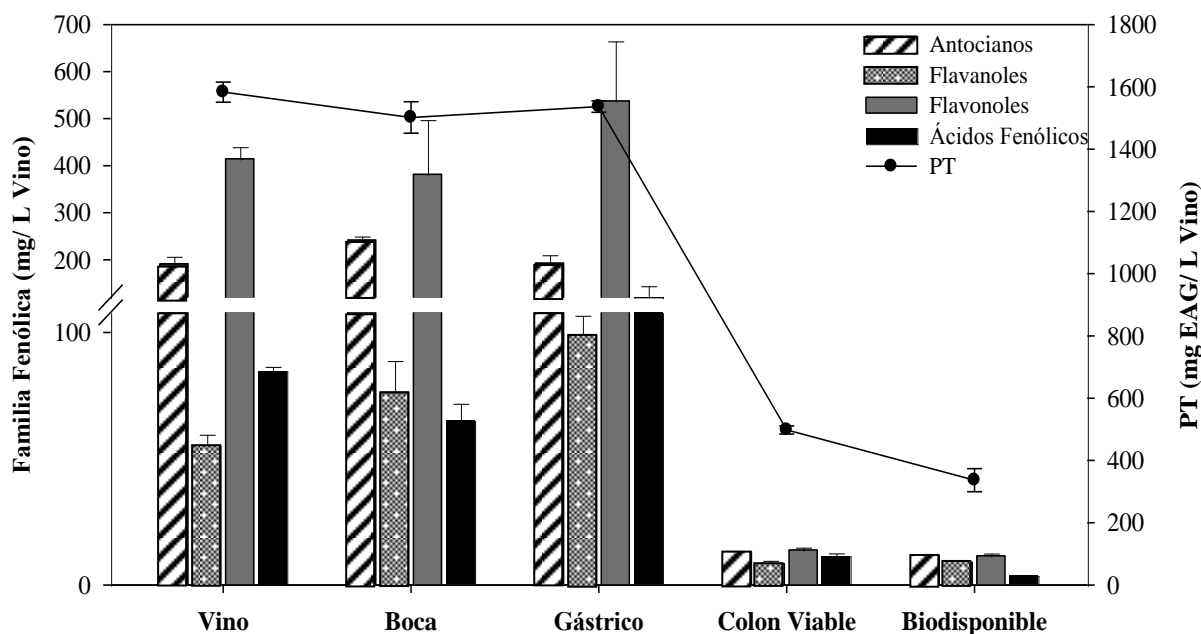


Figura 5.2. Cambios en los polifenoles totales (PT) y en las familias de compuestos polifenólicos a lo largo de la digestión gastro-intestinal *in vitro* del vino tinto.

Los resultados obtenidos para el vino demuestran que, en comparación al incremento observado en la bioaccesibilidad de los PT de la uva con la masticación y la digestión en el estómago, el contenido de PT luego de estas dos etapas del proceso digestivo no mostró diferencias estadísticas respecto al encontrado inicialmente en el vino. 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 bioaccesibles, sin la necesidad de ser extraídos de un tejido vegetal durante la masticación y la digestión en el estómago (Tagliazucchi *et al.*, 2010). Puede observarse que luego de la masticación el 100 % de los flavanoles y flavonoles del vino fueron bioaccesibles, mientras que un 77 % de los ácidos fenólicos se encontraron luego de esta etapa y un incremento (26 %) fue observado para los antocianos. El hecho de que no todos los ácidos fenólicos del vino se encuentren luego de la masticación podría atribuirse a la interacción de estos compuestos con la α -amilasa, principal enzima salival, como ha sido demostrado por Xiao *et al.* (2011), la cual podría estar interfiriendo en la completa detección de estos compuestos en esta etapa del proceso (Laurent *et al.*, 2007). En cuanto al incremento observado para los antocianos, éste podría ser el resultado de la hidrólisis de sus pigmentos poliméricos precursores durante la

etapa de masticación, los cuales no pudieron ser detectados bajo nuestro método de análisis inicialmente en el vino. Así por ejemplo, se puede observar en la **Tabla 5.2** que pigmento A y acetil pigmento A no pudieron ser cuantificados luego de la masticación, mientras que se observó un incremento en sus precursores (malvidina-3-O-glucósido y malvidina-3-O-acetilglucósido, respectivamente). No se encontraron estudios en bibliografía que involucren la etapa de masticación del vino.

Por otro lado, algunos autores que investigan la digestión gastro-intestinal *in vitro* del vino desde la etapa de digestión en el estómago han demostrado que la composición fenólica sufre importantes cambios como consecuencia del proceso (Celep *et al.*, 2015; Gumienna *et al.*, 2011; Martínez-Ortega *et al.*, 2001), sin embargo estas conclusiones son abordadas mediante técnicas espectrofotométricas por lo que no tienen en cuenta el completo perfil polifenólico. Luego de la digestión gástrica el contenido de los flavonoles no sufrió modificaciones, mientras que el contenido de los flavanoles y ácidos fenólicos incrementó hasta concentraciones mayores a las inicialmente encontradas en el vino (incremento del 80 % y 43 % en comparación al vino, respectivamente). En el caso de los antocianos, éstos redujeron levemente su contenido hasta las concentraciones que inicialmente se habían encontrado en el alimento. El incremento observado en los flavanoles, al igual que en las uvas, pone nuevamente en evidencia la inestabilidad de las proantocianidinas bajo las condiciones ácidas gástricas con la consecuente hidrólisis a sus unidades monoméricas, hecho que fue evidenciado por el incremento observado por ejemplo en (-)-epicatequina (**Tabla 5.2**). En cuanto al incremento de los ácidos y disminución de los antocianos, nuestro resultado concuerda parcialmente con lo observado por Rodríguez-Roque *et al.* (2013), quienes vieron un incremento en el contenido de diferentes ácidos fenólicos y una reducción en el contenido de otras familias de polifenoles finalizada la etapa de digestión gástrica de un jugo multifructal. La estabilidad de los polifenoles depende de sus propiedades físico-químicas y de la interacción con constituyentes del fluido gástrico. Asimismo, la liberación de las sustancias fenólicas unidas a proteínas y carbohidratos de la matriz alimenticia por acción de la enzima de digestión gástrica y la influencia del bajo pH de esta etapa explicaría el incremento en el contenido de determinados compuestos fenólicos (Rodríguez-Roque *et al.*, 2013).

Finalmente, se observa que la digestión en el intestino causa una disminución estadísticamente significativa de los PT bioaccesibles, con una consecuente disminución en todas las familias de polifenoles ($p < 0,05$). En comparación a la digestión gástrica, el 46 % de los PT fue degradado luego de la etapa intestinal hecho que, 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. Solo el 31 % de los PT del vino se encontraron en la fracción colon viable, y un 21 % en la fracción de polifenoles biodisponibles.

Como puede observarse en la **Tabla 5.2**, solo 14 compuestos fueron recuperados en la fracción biodisponible de los 35 inicialmente cuantificados en este alimento. En este caso, los más abundantes fueron los ácidos coutárico y fertárico con % R del 37 % y 68 %, respectivamente, y los antocianos petunidina-3-O-acetilglucósido y peonidina-3-O-acetilglucósido, con % R del 40 % y 36 %, respectivamente. Respecto a la fracción colon viable (**Tabla 5.2**) solo 13 compuestos fueron recuperados, de los cuales los más abundantes fueron los ácidos coutárico y fertárico con porcentajes de % R del 45 % y 70 %, respectivamente.

Varios estudios han demostrado la biodisponibilidad de los compuestos polifenólicos de diferentes alimentos utilizando una membrana de diálisis durante la digestión *in vitro*. Así por ejemplo, Rodríguez-Roque *et al.* (2013) estudiaron la biodisponibilidad de los polifenoles de un jugo multifructal observando % R entre el 11 % y el 26 % para diferentes ácidos hidroxicinámicos y entre el 19 % y el 29 % para compuestos pertenecientes a las familias de flavanonas, flavonoles y flavanoles. Por su parte, Celep *et al.* (2015) encontraron % R entre 17 % y el 96 % para compuestos pertenecientes a las familias de ácidos hidroxicinámicos, flavanoles y flavonoles de vinos de arándanos y moras. Sin embargo, no se encontraron trabajos que estudien la biodisponibilidad de los polifenoles de la uva o el vino tinto. Por lo tanto, asumiendo que la diálisis durante el ensayo permitió simular la absorción de los compuestos polifenólicos a través del intestino delgado, podría afirmarse que los compuestos observados en la fracción biodisponible de dichos alimentos estarían disponibles para su absorción *in vivo*, influyendo en la actividad celular para finalmente ejercer su potencial efecto benéfico sobre la salud del hombre.

Tabla 5.2. Contenido (mg/ L de vino) de compuestos polifenólicos individuales en el vino y en las distintas etapas de digestión de dicho alimento. % de Recuperación (%R) con respecto al vino.

Compuesto	Vino	Boca	Gástrico	Colon Viable (%R)	Biodisponible (%R)
Dímero de Procianidina	7,8 ± 0,42	9,05 ± 0,71 b	9,38 ± 0,23 b	< LD a	< LD a
(+)-Catequina	31,28 ± 3,71	47,69 ± 3,94 b	50,18 ± 4,21 b	5,44 ± 0,96 a (17)	6,75 ± 0,45 a (22)
(-)-Epicatequina	15,98 ± 0,82	19,64 ± 9,30 b	39,36 ± 3,96 c	3,03 ± 0,57 a (4)	2,25 ± 0,50 a (14)
Ácido Gálico	8,80 ± 0,51	7,77 ± 5,52 b	18,8 ± 0,62 c	< LC a	< LD a
Etil galato	60,37 ± 1,58	36,05 ± 9,66 b	69,44 ± 18,18 c	6,25 ± 1,05 a (10)	< LC a
Ácido Caftárico	7,47 ± 0,61	10,09 ± 2,73 b	14,02 ± 2,88 b	1,70 ± 0,46 a (23)	0,52 ± 0,10 a (7)
Ácido Coutárico	3,51 ± 0,23	4,22 ± 1,90 b	7,12 ± 0,74 c	1,57 ± 0,43 a (45)	1,29 ± 0,17 a (37)
Ácido Fertárico	2,81 ± 0,15	4,90 ± 0,48 b	8,6 ± 0,84 c	1,96 ± 0,22 a (70)	1,91 ± 0,27 a (68)
Ácido Cafeico	1,84 ± 0,06	2,14 ± 0,75 b	3,38 ± 0,89 c	< LC a	< LC a
Miricetina-3-O-glc	44,93 ± 4,82	28,76 ± 9,20 b	98,84 ± 2,93 c	< LD a	< LD a
Miricetina-3-O-glcr	4,33 ± 0,38	5,88 ± 1,36 b	7,99 ± 0,81 c	< LD a	< LD a
Astilbina	33,30 ± 1,11	27,29 ± 1,43 b	26,53 ± 1,54 b	2,48 ± 0,23 a (8)	2,43 ± 0,46 a (7)
Laricitrina-3-O-glc	31,18 ± 1,30	15,93 ± 1,46 b	32,48 ± 3,1 c	< LC a	1,16 ± 0,03 a (4)
Quercetina-3-O-glcr	171,54 ± 15,12	185,52 ± 77,42 b	219,59 ± 104,93 b	6,01 ± 0,41 a (4)	4,98 ± 0,39 a (3)
Isoquercetina	14,16 ± 0,92	16,41 ± 2,74 b	17,32 ± 6,51 b	2,76 ± 1,02 a (20)	< LC a
Siringetina-3-O-glc	24,98 ± 4,54	29,41 ± 4,77 b	116,48 ± 13,81 c	2,65 ± 0,20 a (11)	2,98 ± 0,35 a (12)
Isorhamnetina-3-O-glc	12,30 ± 0,90	11,59 ± 4,92 b	18,56 ± 0,71 c	< LC a	< LC a
Miricetina	8,69 ± 0,37	2,53 ± 1,42	< LC	< LD	< LD
Quercetina	45,86 ± 2,37	44,23 ± 29,26	< LC	< LD	< LD
Laricitrina	0,99 ± 0,05	< LD	< LD	< LD	< LD
Kaempferol	6,38 ± 0,85	< LD	< LD	< LD	< LD
Isorhamnetina	16,14 ± 0,60	14,33 ± 10,28	< LD	< LD	< LD
Delfinidina-3-O-glc	2,25 ± 0,28	3,84 ± 0,21 c	3,15 ± 0,36 b	< LC a	< LD a
Petunidina-3-O-glc	5,35 ± 0,58	8,24 ± 0,44 c	6,49 ± 0,78 b	< LD a	< LD a
Peonidina-3-O-glc	4,44 ± 0,35	7,24 ± 0,50 c	5,58 ± 0,74 b	0,67 ± 0,23 a (15)	0,69 ± 0,13 a (16)
Malvidina-3-O-glc	126,27 ± 14,73	161,77 ± 9,34 b	146,88 ± 18,38 b	9,09 ± 0,06 a (7)	6,04 ± 0,26 a (5)
Delfinidina-3-O-acglc	0,39 ± 0,04	0,47 ± 0,04 c	0,39 ± 0,06 b	< LD a	< LD a
Petunidina-3-O-acglc	1,17 ± 0,12	1,34 ± 0,12 d	0,71 ± 0,06 c	< LC a	0,47 ± 0,12 b (40)
Malvidina-3-O-acglc	41,1 ± 1,32	54,24 ± 1,01 c	25,37 ± 1,58 b	3,46 ± 0,21 a (8)	2,86 ± 0,03 a (7)
Peonidina-3-O-acglc	4,80 ± 0,39	5,18 ± 0,31 d	4,59 ± 0,44 c	< LC a	1,70 ± 0,15 b (36)
Petunidina-3-O-cmglc	0,28 ± 0,05	< LD	< LD	< LD	< LD
Malvidina-3-O-cmglc	2,60 ± 0,43	< LC	< LC	< LC	< LC
Peonidina-3-O-cmglc	0,46 ± 0,03	< LD	< LD	< LC	< LC
Pigmento A	2,02 ± 0,25	< LD	< LD	< LC	< LC
Acetil Pigmento A	0,45 ± 0,06	< LD	< LD	< LD	< LD

Abreviaturas: glc, glucósido; glcr, glucurónido; ac, acetil; caf, cafeoil; cm, cumaroil; < LD, menor al límite de detección; < LC, menor al límite de cuantificación. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre etapas del proceso de digestión (boca, gástrico, colon viable y biodisponible).

Por otro lado, los resultados de los polifenoles colon viable tanto para uva como para vino, indicarían que cantidades sustanciales 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. Por lo tanto, los compuestos polifenólicos encontrados en la fracción colon viable podrían servir como sustratos para la comunidad microbiana del colon (Possemiers *et al.*, 2011). Existe una creciente evidencia científica que sugiere un efecto positivo de los polifenoles de la dieta sobre la modulación de la composición y actividad de los microorganismos del colon (Cardona *et al.*, 2013). Estudios epidemiológicos demostraron una menor incidencia de cáncer de colon frente al consumo moderado de vino tinto en comparación a otras bebidas alcohólicas (Kontou *et al.*, 2012). Por lo que la realización de ensayos con las fracciones de polifenoles colon viable de la uva y el vino tinto con diferentes cepas bacterianas provenientes del colon constituye un interesante punto de partida para el entendimiento de cómo los polifenoles son metabolizados por esta comunidad microbiana para ejercer su potencial efecto benéfico sobre el organismo humano.

Es importante destacar que los compuestos pertenecientes a la familia de los antocianos fueron encontrados entre aquellos con mayor % R tanto en la fracción biodisponible como en la colon viable de los dos tipos de matrices alimenticias estudiadas (**Tablas 5.1 y 5.2**). Los compuestos antocianos se caracterizan por ser muy estables bajo las condiciones ácidas del estómago (Bermudez-Soto *et al.*, 2007; Stalmach *et al.*, 2012; Talavera *et al.*, 2003). Es así que algunos autores han demostrado que estos compuestos son rápida y eficientemente absorbidos en su forma nativa desde el estómago para ejercer su acción antioxidante en el organismo (Fernandes *et al.*, 2012; Passamonti *et al.*, 2003; Talavera *et al.*, 2003; Vanzo *et al.*, 2008). Por otro lado, solo algunos de estos compuestos que llegan al intestino ingresan al torrente sanguíneo a través de su absorción por el epitelio intestinal mientras que el resto son deglicosilados por las bacterias del intestino. El aglicón formado es altamente inestable bajo las condiciones alcalinas (pH 7,5-8,0) encontradas en esta parte del tracto digestivo por lo que se degrada a chalcona (Keppler & Humpf, 2005). Estas chalconas por descomposición química conducen a la formación de derivados de ácidos fenólicos (**Figura 5.3**). Estos ácidos, más estables y de comparable capacidad antioxidante a sus antocianos precursores, son la forma fenólica mediante la cual ingresan al sistema circulatorio para ejercer sus efectos (Guo *et al.*, 2008; Russell *et al.*, 2009; Talavera *et al.*, 2005). El mismo metabolismo ha sido observado para aquellos antocianos que llegan al colon, y

mediante sus metabolitos derivados de ácidos fenólicos se ha observado que pueden ejercer sus efectos antioxidantes a nivel local, es decir sobre las bacterias del colon, y/o a nivel sistémico, es decir luego de su absorción a través del colon (Keppler & Humpf, 2005).

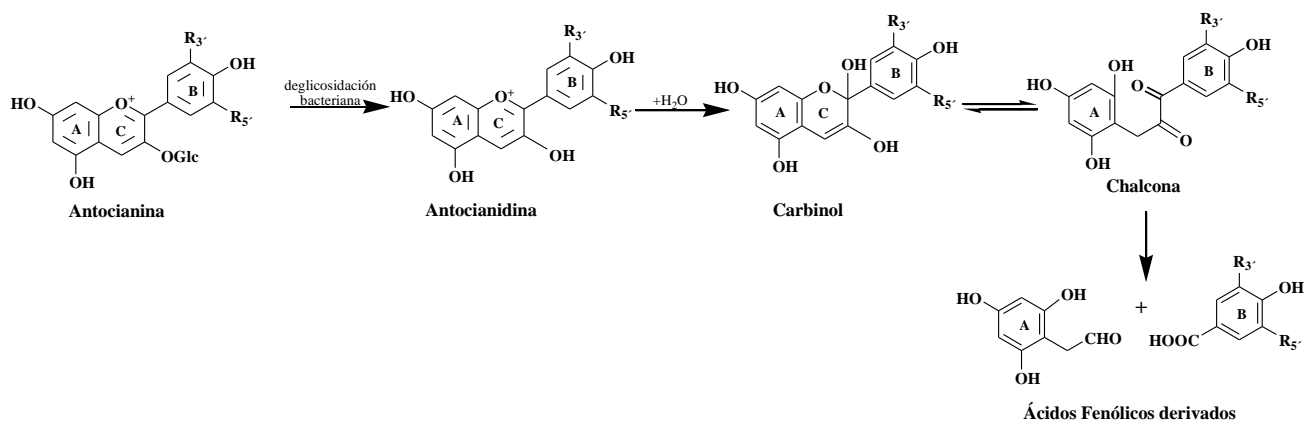


Figura 5.3. Metabolismo de antocianos a pH > 4 para dar ácidos fenólicos. Adaptado de Keppler *et al.* (2005) y Markakis & Jurd (1974). Abreviatura: Glc, glucosa.

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

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 5.4** y **5.5** 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 5.4**) 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 (**Figura 5.1**). Luego de la digestión gástrica la CA no se modifica en comparación a la boca, a pesar de que el contenido de PT mostró un incremento entre dichas etapas (**Figura 5.1**) señalando la influencia de la composición fenólica en este paso del proceso. 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 5.1**).

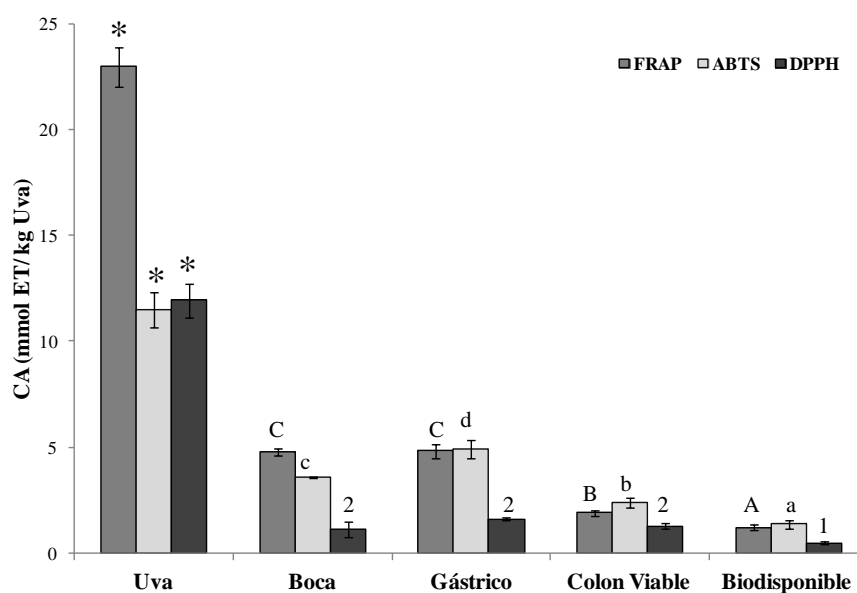


Figura 5.4. Cambios en la capacidad antioxidante (CA) *in vitro* de la uva tinta a lo largo del proceso simulado de digestión gastro-intestinal. CA expresada como: mmol ET/ kg peso fresco de uva. * indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre el extracto de la uva y la boca. Letras y números diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre etapas de la digestión (boca, gástrico, colon viable y biodisponible).

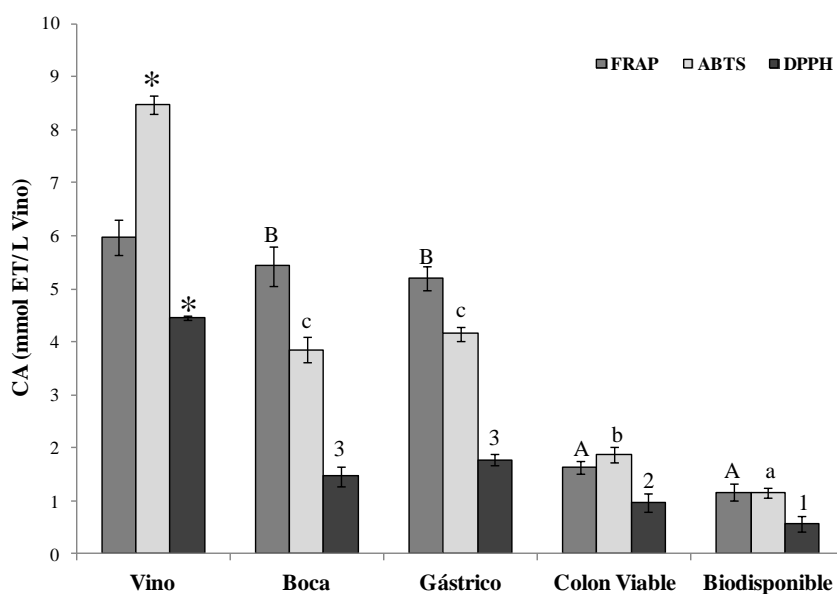


Figura 5.5. Cambios en la capacidad antioxidante (CA) *in vitro* del vino tinto a lo largo del proceso simulado de digestión gastro-intestinal. CA expresada como: mmol ET/ L de vino. * indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) entre el vino y la boca. Letras y números diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) entre etapas de la digestión (boca, gástrico, colon viable y biodisponible).

En el caso de los vinos (**Figura 5.5**) se observó que luego de la digestión en la boca la CA fue significativamente menor en comparación al vino a pesar de que el contenido de PT en ambos fue el mismo (**Figura 5.2**) lo que indicaría que la composición polifenólica derivada de la masticación estaría afectando la CA de la muestra; la CA del resto de las etapas de la digestión mostró la misma tendencia que el contenido de PT (**Figura 5.2**). En resumen, para

ambos alimentos se observó que las variaciones en la CA a lo largo de la digestión son el resultado de los cambios observados en los PT y en la composición polifenólica derivada del proceso digestivo.

5.4 Conclusiones Parciales

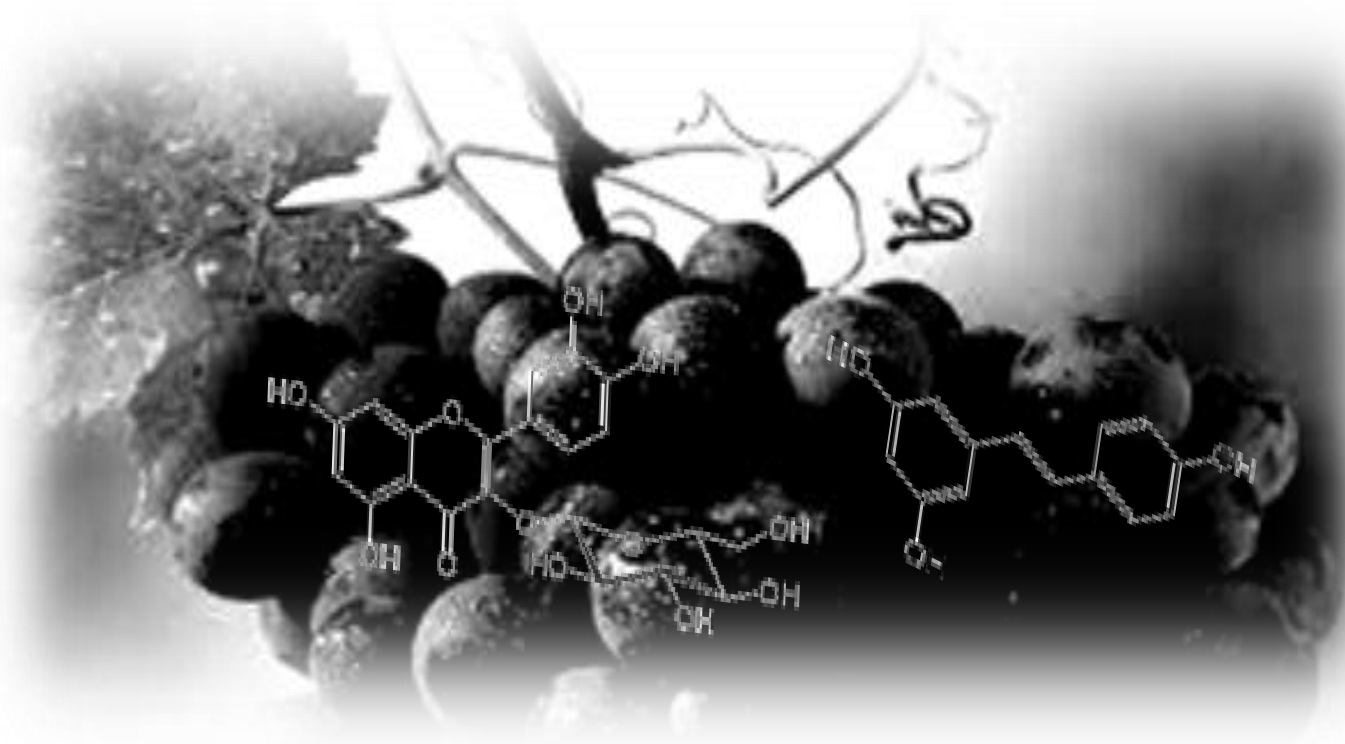
En esta parte de la tesis se estudió la estabilidad y bioaccesibilidad de los compuestos polifenólicos presentes en distintos tipos de matrices alimenticias: la uva, matriz alimenticia sólida, y el vino, matriz alimenticia líquida.

Los resultados obtenidos demostraron que tanto la digestión en la boca como en el estómago incrementan la bioaccesibilidad de los polifenoles totales presentes en una matriz sólida como la uva, mientras que en una matriz líquida como el vino estos compuestos ya se encuentran todos bioaccesibles. Por otro lado, el análisis de los cambios en el perfil de polifenoles a lo largo del proceso digestivo demostró que la estabilidad y, en consecuencia, la bioaccesibilidad de las distintas familias de compuestos polifenólicos se vieron ampliamente influenciadas por los cambios de pH y la actividad de las enzimas digestivas a lo largo del proceso. Luego de la digestión en el intestino, una significativa disminución en los polifenoles bioaccesibles fue observada como consecuencia principalmente del pH alcalino del fluido digestivo.

El estudio de la recuperación de los compuestos luego el proceso digestivo simulado demostró que los antocianos junto con los flavanoles fueron los compuestos que se encontraron biodisponibles en mayor proporción en la uva, mientras que para el vino fueron los antocianos y los ácidos hidroxicinámicos. En la fracción colon viable los antocianos y los ácidos hidroxicinámicos fueron los compuestos en mayor proporción encontrados para la uva y el vino, respectivamente. Estos resultados sugieren que los efectos benéficos de la uva y el vino tinto sobre la salud del hombre podrían ser consecuencia de la acción antioxidante principalmente de los compuestos antocianos tanto biodisponibles como colon viables.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES FINALES



El objetivo general de esta tesis fue evaluar los cambios en las características antioxidantes, es decir perfil polifenólico y capacidad antioxidante, a lo largo del proceso de vinificación de variedades de uvas *Vitis vinifera* L. tintas producidas en Argentina. Dicho objetivo buscó aportar al conocimiento sobre la calidad desde el punto de vista funcional de la uva, el vino y el orujo, y sobre los mecanismos de acción por los cuales los compuestos polifenólicos presentes en estas muestras ejercerían su potencial actividad antioxidante sobre sistemas biológicos.

Los resultados obtenidos del estudio del contenido de polifenoles totales (PT) demostraron que ninguna variedad se caracterizó por el mayor contenido de PT en todas las muestras estudiadas a lo largo de la vinificación, sino que éste fue dependiente de la etapa del proceso analizado. Se observó que el perfil polifenólico fue característico de cada variedad y que sufre importantes cambios cuali y cuantitativos como consecuencia de la vinificación. En este sentido, los principales cambios observados fueron hidrólisis de flavonoles glicosilados, de ácidos hidroxicinamoil tartáricos, y de ésteres del ácido gálico con flavanoles; por otro lado, también se observó la formación de pigmentos derivados de antocianos.

La variedad Syrah se caracterizó por el mayor contenido en compuestos antocianos; Merlot se destacó por su mayor contenido en *trans*-resveratrol; mientras que el perfil característico de Cabernet Sauvignon fue determinado por la etapa del proceso de vinificación analizada.

El estudio de la capacidad antioxidante (CA) *in vitro* e *in vivo* mostró diferencias entre variedades y muestras a lo largo de la vinificación. La utilización del análisis de correlación canónica (ACC) y análisis de regresión múltiple (ARM) permitieron explicar dichas diferencias, demostrando la alta influencia del tipo y contenido (perfil cuali y cuantitativo) de compuesto polifenólico en la bioactividad de las muestras. Específicamente, el ARM puso en evidencia que esta propiedad podría ser el resultado de la combinación de efectos antioxidantes y pro-oxidantes que los compuestos polifenólicos ejercen sobre las mismas.

Para la CA *in vitro*, no hubo una variedad que se destacara con la mayor actividad a lo largo de todo el proceso de vinificación. Los análisis de ARM señalaron a los antocianos y flavanoles como las principales familias de polifenoles con contribución significativa a esta CA.

Por otro lado, el estudio de la CA *in vivo* utilizando *S. cerevisiae* demostró que la variedad Syrah fue la que presentó la mayor actividad biológica como consecuencia de su perfil polifenólico caracterizado por el mayor contenido en compuestos antocianos. Además, se observó que el mayor contenido de *trans*-resveratrol en la uva y el vino Merlot contribuyó a su menor actividad. Entre las muestras estudiadas, la uva presentó la mayor bioactividad consecuencia de su perfil polifenólico diferencial (mayor contenido de kaempferol-3-O-glucósido y ácido férulico) en comparación al vino y el orujo (mayor contenido de etil galato). Es importante destacar que la CA tanto *in vitro* como *in vivo* de los orujos fue comparable a la de los vinos, resultado que impulsaría la recuperación de este residuo agroindustrial como una fuente rica de compuestos potencialmente bioactivos.

En relación a los mecanismos de acción biológica, se demostró que la CA de las muestras va más allá del poder reductor y/o de captación de radicales libres de sus polifenoles constituyentes. En este sentido, uno de los mecanismos por los cuales los polifenoles reducirían el estrés oxidativo, es el incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes GPx y GR con una consecuente disminución en la oxidación intracelular. Asimismo, los estudios proteómicos demostraron que los polifenoles modifican la expresión de ciertas proteínas involucradas en el metabolismo de aminoácidos, proteínas y ADN. Estos resultados sugieren que la actividad biológica de la uva, el orujo y el vino sería consecuencia del efecto hormético de sus compuestos polifenólicos sobre la célula, lo que les implicaría actuar como leves agentes pro-oxidantes, generando en la célula una respuesta adaptativa, probablemente activando la síntesis de proteínas en respuesta a estrés e induciendo la actividad de enzimas antioxidantes, que la prepara para futuras situaciones de estrés severos. Por otro lado, el estudio de la CA utilizando células HepG2 representó evidencia adicional del poder antioxidante del vino tinto, demostrando nuevamente a la variedad Syrah como aquella con la mayor CA.

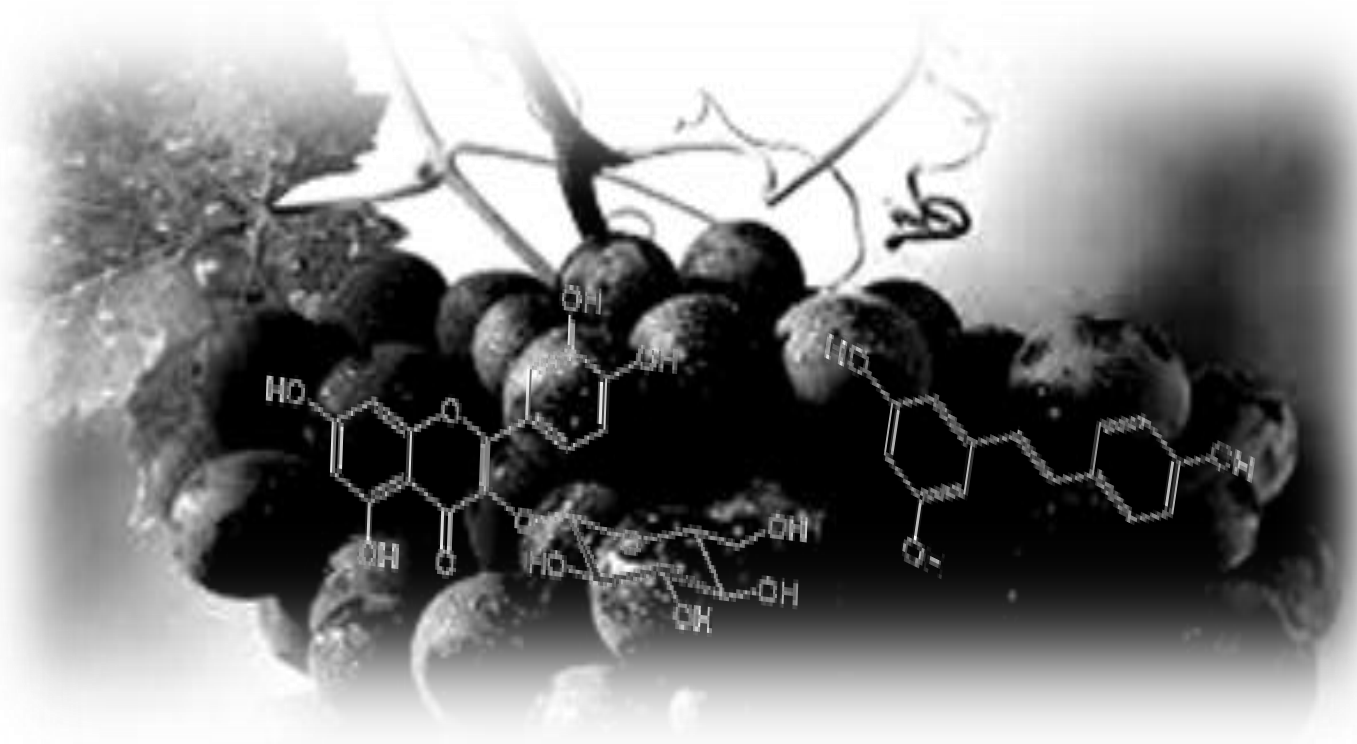
Finalmente se estudió la estabilidad y bioaccesibilidad de los compuestos polifenólicos antioxidantes de la uva y el vino mediante un modelo que simula la digestión gastro-intestinal humana y posterior absorción a través del epitelio intestinal. La digestión de la uva en la boca y en el estómago incrementan la bioaccesibilidad de sus PT, mientras que en el vino (matriz alimenticia líquida) estos compuestos ya se encuentran todos bioaccesibles. El perfil de polifenoles se vio modificado 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 compuestos detectados inicialmente en uva y vino, lograron identificarse luego de la digestión intestinal

siendo los antocianos los que se recuperaron en mayor porcentaje tanto en la fracción biodisponible como en la colon viable.

En adición a la influencia del tipo y contenido de compuesto polifenólico sobre la CA de la uva, el orujo y el vino, a lo largo de esta tesis doctoral se observó que los polifenoles identificados con la mayor contribución a la CA, tanto *in vitro* como *in vivo*, como así también aquellos observados en mayor porcentaje, tanto en la fracción biodisponible como en la colon viable, fueron diferentes dependiendo del ensayo empleado para su estudio. Sin embargo, es importante destacar que aquellos pertenecientes a la familia de compuestos antocianos fueron los que siempre demostraron la mayor contribución a la CA; e incluso, se observó que este tipo de compuestos fueron capaces de resistir las condiciones del tracto gastro-intestinal para encontrarse biodisponibles, y también ejercer su acción a nivel de colon. En su conjunto, estos resultados pondrían en evidencia que el verdadero rol biológico de los polifenoles no solo depende de sus estructuras químicas, sino que además estaría ampliamente influenciado por el entorno en el que se encuentran: alimento, procesamiento del mismo, interacción con componentes celulares, y estabilidad y bioaccesibilidad bajo las condiciones del tracto digestivo. Por lo tanto, estudios integrales como el realizado en esta tesis, que contemplen todos aquellos factores influyentes en la CA de los alimentos, deberían ser considerados para evaluar la verdadera CA de la uva tinta *V.vinifera* L. y sus productos derivados del procesamiento, el vino y el orujo, donde una alta concentración y gran variedad de compuestos polifenólicos están presentes.

Finalmente, de esta tesis surge la necesidad de realizar estudios que permitan avanzar en el entendimiento de los mecanismos de acción por los cuales los polifenoles de la uva, el orujo y el vino ejercerían su acción antioxidante sobre los sistemas biológicos, con el fin de confirmar la hipótesis del efecto hormético de estos compuestos y la influencia específica de los antocianos sobre dicha acción biológica.

BIBLIOGRAFÍA



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.
- Alcalde-Eon, C., Escribano-Bailón, M. T., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2006). Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing. A comprehensive study. *Analytica Chimica Acta*, 563, 238-254.
- Anderson, N. L., Matheson, A. D., & Steiner, S. (2000). Proteomics: applications in basic and applied biology. *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 408-412
- Antoniolli, A., Fontana, A. R., Piccoli, P., & Bottin, R. (2015). Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. *Food Chemistry*, 178, 172-178.
- Araújo, J. R., Gonçalves, P., & Martel, F. (2011). Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutrition Research*, 31, 77-87.
- Arnous, A., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2001). Effect of Principal Polyphenolic Components in Relation to Antioxidant Characteristics of Aged Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5736-5742.
- 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.
- Atanacković, M., Petrović, A., Jović, S., Gojković-Bukarica, L., Bursać, M., & Cvejić, J. (2012). Influence of winemaking techniques on the resveratrol content, total phenolic content and antioxidant potential of red wines. *Food Chemistry*, 131, 513-518.
- Ávalos García., A., & Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2, 119-145.

B

- Bakker, J., & Timberlake, C. F. (1997). Isolation, Identification, and Characterization of New Color-Stable Anthocyanins Occurring in Some Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 35-43.
- Barcia, M. T., Pertuzatti, P. B., Gómez-Alonso, S., Godoy, H. T., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2014a). Phenolic composition of grape and winemaking by-products of Brazilian hybrid cultivars BRS Violeta and BRS Lorena. *Food Chemistry*, 159, 95-105.
- Barcia, M. T., Pertuzatti, P. B., Rodrigues, 549 D., Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I., & Godoy, H. T. (2014b). Occurrence of low molecular weight phenolics in *Vitis vinífera* red grape cultivars and their winemaking by-products from São Paulo (Brazil). *Food Research International*, 62, 500-513.

- Baroni, M. V., Di Paola Naranjo, R. D., García-Ferreira, C., Otaiza, S., & Wunderlin, D. A. (2012). How good antioxidant is the red wine? Comparison of some *in vitro* and *in vivo* methods to assess the antioxidant capacity of Argentinean red wines. *LWT - Food Science and Technology*, 47, 1-7.
- Bastow, E. L., Gourlay, C. W., & Tuite, M. F. (2011). Using yeast models to probe the molecular basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemical Society Transaction*, 39, 1482-1487.
- Bayliak, M. M., Burdyliuk, N. I., & Lushchak, V. I. (2015). Quercetin increases stress resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* not only as an antioxidant. *Annals of Microbiology*, 1-8.
- Bayliak, M. M., Burdyliuk, N. I., Izers'ka, L. I., & Lushchak, V. I. (2014). Concentration-dependent effects of *Rhodiola Rosea* on longterm survival and stress resistance of yeast *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of Yap 1 and Msn2/4 regulatory proteins. *Dose-Response*, 12,93-109.
- Belihna, I., Amorim, M. A. L., Rodrigues, P., De Freitas, V., Moradas-Ferreira, P., Mateus, N., *et al.* (2007). Quercetin increases oxidative stress resistance and longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55, 2446-2451.
- Benito, S., Morata, A., Palomero, F., González, M. C., & Suárez-Lepe, J. A. (2011). Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia guilliermondii* in red wines produced following different fermentation strategies. *Food Chemistry*, 124, 15-23.
- 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.
- Bermudez-Soto, M. J., Tomas-Barberan, F. A., & Garcia-Conesa, M. T. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, 102, 865-874.
- Bimpilas, A., Tsimogiannis, D., Balta-Brouma, K., Lymperopoulou, T., & Oreopoulou, V. (2015). Evolution of phenolic compounds and metal content of wine during alcoholic fermentation and storage. *Food Chemistry*, 178, 164-171.
- Blouin, J., & Peynaud, E. (2004). Capítulo 4: La extracción de mostos. *Enología Práctica. Conocimiento y elaboración del vino*. Edición 4^{ta}; Mundi-Prensa Madrid; España.
- Borazan, A. A., & Bozan, B. (2013). The influence of pectolytic enzyme addition and prefermentative mash heating during the winemaking process on the phenolic composition of Okuzgozu red wine. *Food Chemistry*, 138, 389-395.
- Bornsek, S. M., Ziberna, L., Polak, T., Vanzo, A., Ulrih, N. P., Abram, V., Tramer, F., & Passamonti, S. (2012). Bilberry and blueberry anthocyanins act as powerful intracellular antioxidants in mammalian cells. *Food Chemistry*, 134, 1878-1884.
- Bracesco, N., Dell, M., Rocha, A., Behtash, S., Menini, T., Gugliucci, A., & Nunes, E. (2003). Antioxidant Activity of a Botanical Extract Preparation of *Ilex paraguariensis*: Prevention of DNA Double-Strand Breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and Human

Low- Density Lipoprotein Oxidation. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 9, 379-387.

- Bracesco, N., Salvo, V. A., Rocha, S., Dell, M., Carrau, F., & Nunes, E. (2007). Exploración del efecto protector frente a radicales libres de derivados de la uva (*Vitis vinifera* L. Cv. Tannat) en *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Argentina de Microbiología*, 39, 4-10.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Braicu, C., Ladomery, M. R., Chedea, V. S., Irimie, A., & Berindan-Neagoe, I. (2013). The relationship between the structure and biological actions of green catechins. *Food Chemistry*, 141, 3282-3289.
- 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.
- Burns, J., Gardner, P. T., Matthews, D., Duthie, G. G., Lean, M. E. J., & Crozier, A. (2001). Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5797-5808.

C

- Casares Faulín, A. B. (2010). Análisis de polifenoles en los vinos mediante técnicas de separación. Universidad Politécnica de Catalonia.
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J., & Queipo-Ortuño, M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24, 2013, 1415-1422.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Chedea, V. S., Braicu, C., & Socaciu, C. (2010). Antioxidant/prooxidant activity of polyphenolic grape seed extract. *Food Chemistry*, 121, 132-139.
- Cheminet, G. (2013). Determinación del perfil de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de yerba mate (*Ilex paraguariensis*). Universidad Nacional de Córdoba.
- Chen, C., Jiang, X., Zhao, W., & Zhang, Z. (2013). Dual role of resveratrol in modulation of genotoxicity induced by sodium arsenite via oxidative stress and apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 8-17.
- Cho, Y. S., Schiller, N. L., Kahng, H. Y., & Oh, K. H. (2007). Cellular Responses and Proteomic Analysis of *Escherichia coli* Exposed to Green Tea Polyphenols. *Current Microbiology*, 55, 501-506.
- Choueiri, L., Chedea, V. S., Calokerinos, A., & Kefalas, P. (2012). Antioxidant/pro-oxidant properties of model phenolic compounds. Part II: Studies on mixtures of polyphenols at different molar ratios by chemiluminescence and LC-MS. *Food Chemistry*, 133, 1039- 1044.
- Cigut, T., Polak, T., Gašperlin, L., Raspor, P., & Jamnik, P. (2011). Antioxidant Activity of Propolis Extract in Yeast Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 11449-11455.
- Cilla, A., González-Sarrías, 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.
- Costa, V., & Moradas-Ferreira, P. (2001). Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 22, 217-246.
- Criqui, M. H., & Ringel, B. L. (1994). Does diet or alcohol explain the French paradox?. *Lancet*, 344, 1719-1723.

D

- Dai, M. S., & Lu, H. (2004). Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 44475-44482.

- Dani, C., Bonatto, D., Salvador, M., Pereira, M. D., Henriques, J. A. P., & Eleutherio, E. (2008). Antioxidant Protection of Resveratrol and Catechin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4268-4272.
- Dani, C., Oliboni, L. S., Vanderlinde, R., Pra, D., Dias, J. F., Yoneama, M. L., Bonatto, D., Salvador, M., & Henriques, J. A. P. (2009). Antioxidant Activity and Phenolic and Mineral Content of Rose Grape Juice. *Journal of Medicinal Food*, 12, 188-192.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Sczzocchio, B., & Massella R. (2010). Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 1321-1342.
- de Villiers, A., Vanhoenacker, G., Majek, P., & Sandra, P. (2004). Determination of anthocyanins in wine by direct injection liquid chromatography-diode array detection mass spectrometry and classification of wines using discriminant analysis. *Journal of Chromatography A*, 1054, 195-204.
- Ding, S., Dudley, E., Plummer, S., Tang, J., Newton, R. P., & Brenton, A. G. (2008). Fingerprint profile of Ginkgo biloba nutritional supplements by LC/ESI-MS/MS. *Phytochemistry*, 69, 1555-1564.
- Doudican, N. A., Song, B., Shadel, G. S., & Doetsch, P. W. (2005). Oxidative DNA Damage Causes Mitochondrial Genomic Instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 25, 5196-5204.
- Downey, M. O., Dokoozlian, N. K., & Krstic, M. P. (2006). Cultural Practice and Environmental Impacts on the Flavonoid Composition of Grapes and Wine: A Review of Recent Research. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 257-268.
- 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.
- Drotar, A., Phelps, P., & Fall, R. (1985). Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Science*, 42, 35-40.
- Dumas, R., Biou, V., Halgand, F., Douce, Roland, & Duggleby, R. G. (2001). Enzymology, Structure, and Dynamics of Acetohydroxy Acid Isomeroreductase. *Accounts of Chemical Research*, 34, 399-408.
- Dumitriu, D., Peinado, R. A., Peinado, J., & López de Lerma, N. (2015). Grape pomace extract improves the *in vitro* and *in vivo* antioxidant properties of wines from sun light dried Pedro Ximénez grapes. *Journal of Functional Foods*, 17, 380-387.

E

- El Darra, N., Turk, M. F., Ducasse, M-A., Grimi, N., Maroun, R. G., Louka, N., & Vorobiev, E. (2016) Changes in polyphenol profiles and color composition of freshly fermented model wine due to pulsed electric field, enzymes and thermovinification pretreatments. *Food Chemistry*, 194, 944-950.
- Escoté, X., Miranda, M., Menoyo, S., Rodríguez-Porrata, B., Carmona-Gutiérrez, D., Jungwirth, H., Madeo, F., Cordero, R. R., Mas, A., Tinahones, F., Clotet, J., &

Vendrell, J. (2012). Resveratrol induces antioxidant defence via transcription factor Yap1p. *Yeast*, 29, 251-263.

F

- Fantini, M., Benvenuto, M., Masuelli, L., Frajese, G. V., Tresoldi, I., Modesti, A., & Bei, R. (2015). *In Vitro* and *in Vivo* Antitumoral Effects of Combinations of Polyphenols, or Polyphenols and Anticancer Drugs: Perspectives on Cancer Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 9236-9282.
- Farrugia, G., & Balzan, R. (2012). Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Frontiers in Oncology*, 2, 1-21.
- Fernandes, I., de Freitas, V., Reis, C., & Mateus, N. (2012). A new approach on the gastric absorption of anthocyanins. *Food & Function*, 3, 508-516.
- Fernández, K., & Labra, J. (2013). Simulated digestion of proanthocyanidins in grape skin and seed extracts and the effects of digestion on the angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *Food Chemistry*, 139, 196-202.
- Fernández-Pachón, M. S., Berná, G., Otaolauruchi, E., Troncoso, A. M., Martín, F., & García-Parilla, M. C. (2009). Changes in Antioxidant Endogenous Enzymes (Activity and Gene Expression Levels) after Repeated Red Wine Intake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6578-6583.
- Fernández-Pachón, M. S., Villaño, D., García-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2004). Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Analytical Chimica Acta*, 513, 113-118.
- Figueiredo-González, M., Martínez-Carballo, E., Cancho-Grande, B., Santiago, J. L., & Martínez, M. C. (2012). Pattern recognition of three *Vitis vinifera* L. red grapes varieties based on anthocyanin and flavonol profiles, with correlations between their biosynthesis pathways. *Food Chemistry*, 130, 9-19.
- Fontana, A. R., Antonioli, A., & Bottini, R. (2013). Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 8987-9003.
- Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160, 171-177.
- 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.
- Frassinetti, S., Della Croce, C. M., Caltavuturo, L., & Longo, V. (2012). Antimutagenic and antioxidant activity of Lisosan G in *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*, 135, 2029-2034.

G

- García-Becerra, L., Mitjans, M., Rivas-Morales, C., Verde-Star, J., Oranday-Cárdenas, A., & Vinardell, M. P. (2016). Antioxidant comparative effects of two grape pomace Mexican extracts from vineyards on erythrocytes. *Food Chemistry*, 194, 1081-1088.
- Garrido, J., & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols- A chemical perspective. *Food Research International*, 54, 1844-1858.
- 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. (2010). Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Major Australian Red Wines throughout the Winemaking Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10133-10142.
- 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.
- Granato, D., Katayama, F. C. U., & Castro, I. A. (2010). Assessing the association between phenolic compounds and the antioxidant activity of Brazilian red wines using chemometrics. *LWT- Food Science and Technology*, 43, 1542-1549.
- Grønbæk, 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.
- Guiteras Ferrás, J. (1943). Valoración y aprovechamiento de algunos subproductos y residuos. Anales de la Escuela de Peritos Agrícolas y Superior de Agricultura y de los Servicios Técnicos de Agricultura, 3, 299-313.
- 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.
- Guo, X., Chen, X., Li, L., Shen, Z., Wang, X., Zheng, P., Duan, F., Ma, Y., & Bi, K. (2008). LC-MS determination and pharmacokinetic study of six phenolic components in rat plasma after taking traditional Chinese medicinal-preparation: Guanxinning lyophilized powder for injection. *Journal of Chromatography*, 873, 51-58.

H

- Halliwell, B. (1995). Antioxidant characterization; methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 49, 1341-1348.
- He, K., Li, X., Ye, X., Yuan, L., Li, X., Chen, X., & Deng, Y. (2012). A mitochondria-based method for the determination of antioxidant activities using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate oxidation. *Food Research International*, 48, 454-461.

- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., & Cabisco, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780, 1217-1235.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- 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.
- 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

- Ignea, C., Dorobanțu, C. M., Mintoff, C. P., Branza-Nichita, N., Ladomery, M. R., Kefalas, P., & Chedea, V. S. (2013). Modulation of the antioxidant/pro-oxidant balance, cytotoxicity and antiviral actions of grape seed extracts. *Food Chemistry*, 141, 3967-3976.
- Im, S.-E., Nama, T.-G., Lee, H., Han, M.-W., Heo, H. J., Koo, S. I., Lee, C. Y., & Kim, D.-O. (2013). Anthocyanins in the ripe fruits of *Rubus coreanus* Miquel and their protective effect on neuronal PC-12 cells. *Food Chemistry*, 139, 604-610.
- 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. (2011a). Polyphenolic content of Vranec wines produced by different vinification conditions. *Food Chemistry*, 124, 316-325.
- Ivanova, V., Stefova, M., Vojnoski, B., Dörnyei, A., Márk, L., Dimovska, V., Stafilov, T., & Kilár, F. (2011b). Identification of polyphenolic compounds in red and white grape varieties grown in R. Macedonia and changes of their content during ripening. *Food Research International*, 44, 2851-2860.

J

- Jakobek, L. (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*, 175, 556-567.
- Jiménez, A., Lisa-Santamaría, P., García-Marino, M., Escribano-Bailón, M. T., Rivas-Gonzalo, J. C., & Revuelta, J. L. (2010). The biological activity of the wine anthocyanins delphinidin and petunidin is mediated through Msn2 and Msn4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of European Microbiological Societies Yeast Research*, 10, 858-869.

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.

- Keppler K., & Humpf H. U. (2005). Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13, 5195-5205.
- Khan, M. F., Bennett, M. J., Jumper, C. C., Percy, A. J., Silva, L. P., & Schriemer, D. C. (2011). Proteomics by mass spectrometry-Go big or go home?. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55, 832-841.
- Kim, I. S., Hae, S. Y., & Ing, N. J. (2007). Comparative Proteomic Analyses of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377 Strain Against Menadione-Induced Oxidative Stress. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 207-217.
- Kim, J. H., Campbell, B. C., Yu, J., Mahoney, N., Chan, K. L., Molyneux, R. J., Bhatnagar, D., & Cleveland, T. E. (2005). Examination of fungal stress response genes using *Saccharomyces cerevisiae* as a model system: targeting genes affecting aflatoxin biosynthesis by *Aspergillus flavus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 807-815.
- 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.
- Konstantakopoulos, N., Larsen, M. R., Campbell, I. G., Quinn, M. A., Baker, M. S., Georgiou, H. M., & Rice, G. E. (2007). Genistein-Induced Proteome Changes in the Human Endometrial Carcinoma Cell Line, Ishikawa. *Clinical Proteomics*, 2, 153-167.
- Kontou, N. R. D., Psaltopoulou, T. M. D., Soupos, N. M. D., Polychronopoulos, E. M. D., Xinopoulos, D. M. D., Linos, A. M. D., & Panagiotakos, D. (2012). Alcohol Consumption and Colorectal Cancer in a Mediterranean Population: A Case-Control Study. *Diseases of the Colon & Rectum*, 55, 703-710.

L

- Lante, A., Nardi, T., Zocca, F., Giacomini, A., & Corich, V. (2011). Evaluation of Red Chicory Extract as a Natural Antioxidant by Pure Lipid Oxidation and Yeast Oxidative Stress Response as Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5318-5324.
- Laurent, C., Besançon, P., & Caporiccio, B. (2007). Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. *Food Chemistry*, 100, 1704-1712.
- Lee, J., & Rennaker, C. (2011). Influence of extraction methodology on grape composition values. *Food Chemistry*, 126, 295-300.
- Liang, N. N., Zhu, B. Q., Han, S., Wang, J. H., Pan, Q. H., Reeves, M. J., Duan, C. Q., & He, F. (2014). Regional characteristics of anthocyanin and flavonol compounds from grapes of four *Vitis vinifera* varieties in five wine regions of China. *Food Research International*, 64, 264-274.
- 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.
- 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.
- Longo, V., Ždravlević, M., Guaragnella, N., Giannattasio, S., Zolla, L., & Timperio, A. M. (2015). Proteome and metabolome profiling of wild-type and YCA1-knock-out yeast cells during acetic acid-induced programmed cell death. *Journal of Proteomics*, 128, 173-188.
- López de Lerma, N., Peinado, J., & Peinado, R. A. (2013). *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of musts and skin extracts from off-vine dried *Vitis vinifera* cv. “Tempranillo” grapes. *Journal of Functional Foods*, 5, 914-922.
- Lushchak, V. I. (2011). Adaptative response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 153, 175-190.

M

- Mabry, T. J., Markham, K. R., & Thomas, M. B. (1970). The structure analysis of flavonoids by ultraviolet spectroscopy. En: *The Systematic Identification of Flavonoids*. Ed. Springer-Verlag, Alemania, p. 35.
- Maeta, K., Nomura, W., Takatsume, Y., Izawa, S., & Inoue, Y. (2007). Green Tea Polyphenols Function as Prooxidants To Activate Oxidative-Stress-Responsive Transcription Factors in Yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 572-580.
- 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.
- Mager, W. H., & Winderickx, J. (2005). Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26, 265-273.
- Makris, D. P., Boskou, G., & Andrikopoulos, N. K. (2007). Polyphenolic content and *in vitro* antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 125-132.
- 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.

- 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.
- Markakis, P., & Jurd, L. (1974). Anthocyanins and their stability in foods. *C R C Critical Reviews in Food Technology*, 4, 437-456.
- Martín, S., González-Burgos, E., Carretero, M. E., & Gómez-Serranillos, M. P. (2011). Neuroprotective properties of Spanish red wine and its isolated polyphenols on astrocytes. *Food Chemistry*, 128, 40-48.
- Martínez-Navarrete, N., del Mar Camacho Vidal, M., & Martínez Lahuerta, J. J. (2008). Los compuestos fenólicos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Actividad Dietética*, 2, 64-68.
- Martínez-Ortega, M. V., García-Parilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2001). Changes in phenolic composition of wines submitted to *in vitro* dissolution tests. *Food Chemistry*, 73, 11-16.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M. J., & Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericano de Nutrición*, 50, 5-18.
- Martorell, P., Forment, J. V., de Llanos, R., Montón, F., Llopis, S., González, N., Genovés, S., Cienfuegos, E., Monzó, H., & Ramón, D. (2011). Use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans* as Model Organisms To Study the Effect of Cocoa Polyphenols in the Resistance to Oxidative Stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2077-2085.
- Mascarenhas, C., Edwards-Ingram, L. C., Zeef, L., Shenton, D., Ashe, M. P., & Grant, C. M. (2008). Gcn4 Is Required for the Response to Peroxide Stress in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 19, 2995-3007.
- Mathy, G., Navet, R., Gerkens, P., Leprince, P., De Pauw, E., Sluse-Goffart, C. M., Sluse, F. E., & Douette, P. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* Mitoproteome Plasticity in Response to Recombinant Alternative Ubiquinol Oxidase. *Journal of Proteome Research*, 5, 339-348.
- Mattson, M. P. (2008). Hormesis defined. *Ageing Research Review*, 7, 1-7.
- Mazza, G. (1995). Anthocyanins in grape products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35, 341-371.
- McDougall, G. J., Fyffe, S., Dobson, P., & Stewart, D. (2005). Anthocyanins from red wine - Their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 66, 2540-2548.
- Monagas, M., Núñez, V., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2003a). Anthocyanin-derived Pigments in Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon Wines Produced in Spain. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 163-169.
- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Laureano, O., & da Silva, J. M. R. (2003b). 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.

Monagas, M., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2005a). Updated Knowledge About the Presence of Phenolic Compounds in Wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 85-118.

Monagas, M., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2005b). Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle-II. Non-anthocyanin phenolic compounds. *European Food Research and Technology*, 220, 331-340.

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.

Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Calderón, F., & Suárez, J. A. (2006). Effects of pH, temperature and SO₂ on the formation of pyranoanthocyanins during red wine fermentation with two species of *Saccharomyces*. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 123-129.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.

Mozetič, B., Tomažič, I., Škvarč, A., & Trebše, P. (2006). Determination of Polyphenols in White Grape Berries cv. Rebula. *Acta Chimica Slovenica*, 53, 58-64.

N

Niki, E. (2010). Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 503-515.

Niki, E., (2011). Antioxidant capacity: which capacity and how to assess it?. *Journal of Berry Research*, 1, 169-176.

Núñez, V., Monagas, M., Gomez-Cordovés, M. C., & Bartolomé, B. (2004). *Vitis vinifera* L. cv. Graciano grapes characterized by its anthocyanin profile. *Postharvest Biology and Technology*, 31, 69-79.

O

OIV (2015). World vitiviniculture situation. 38th World Congress of Vine and Wine. *International Organization of Vine and Wine*. Disponible desde: http://www.oiv.int/oiv/info/en-Bilan_OIV_Mainz_2015.

P

Panceri, C. P., Gomes, T. M., De Gois, J. S., Borges, D. L. G., & Bordignon-Luiz, M. T. (2013). Effect of dehydration process on mineral content, phenolic compounds and antioxidant activity of Cabernet Sauvignon and Merlot grapes. *Food Research International*, 54, 1343-1350.

- Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., & Mattivi, F. (2003). The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Letters*, 544, 210-213.
- Peinadoa, J., López de Lerma, N., Peralbo-Molina, A., Priego-Capote, F., de Castro, C., & McDonagha, B. (2013). Sunlight exposure increases the phenolic content in postharvested white grapes. An evaluation of their antioxidant activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Functional Foods*, 5, 1566-1575.
- Pereira, M. D., Herdeiro, R. S., Fernandes, P. N., Eleutherio, E. C. A., & Panek, A. D. (2003). Targets of oxidative stress in yeast sod mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1620, 245-251.
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Díaz- Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41, 274-285.
- 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.
- Pietta, P. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042.
- Podio, N. S. (2015). Huella Dactilar de Trigo Argentino: Evaluación de la trazabilidad química y las características antioxidantes de trigo, harina y derivados. Universidad Nacional de Córdoba.
- Podsędek, A., Redzynia, M., Klewicka, E., & Koziółkiewicz, M. (2014). Matrix Effects on the Stability and Antioxidant Activity of Red Cabbage Anthocyanins under Simulated Gastrointestinal Digestion. *BioMed Research International*, 2-11.
- Possemiers, S., Bolca, S., Verstraete, W., & Heyerick, A. (2011). The intestinal microbiome: A separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals. *Fitoterapia*, 82, 53-66.
- 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.
- 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.
- Renaud, S., & De Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339, 1523-1526.
- Rentzsch, M., Schwarz, M., Winterhalter, P., Blanco-Vega, D., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2010). Survey on the content of vitisin A and hydroxyphenyl pyranoanthocyanins in Tempranillo wines. *Food Chemistry*, 119, 1426-1434.
- Rice-Evans, C. (2001). Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, 8, 797-807.
- Rice-Evans, C. A., & Miller, N. J. (1994). Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymology*, 234, 279-293.
- Rivero-Pérez, M. D., Muniz, P., & González-Sanjosé, M. L. (2008). Contribution of anthocyanin fraction to the antioxidant properties of wine. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2815-2822.
- 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.
- Rodrigo, R., Miranda, A., & Vergara, L. (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*, 412, 410-424.
- 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.
- Rohn, S., Rawel, H. M., & Kroll, J. (2004). Antioxidant activity of protein-bound quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4725-4529.
- Royall J. A., & Ischiropoulos H. (1993). Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Archives in Biochemistry and Biophysics*, 302, 348-355.
- 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.
- Russell, W. R., Scobbie, L., Labat, A., & Duthie, G. G. (2009). Selective bio-availability of phenolic acids from Scottish strawberries. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, S85-S91.

S

- Samra, M. A., Chedea, V. S., Economou, A., Calokerinos, A., & Kefalas, P. (2011). Antioxidant/prooxidant properties of model phenolic compounds: Part I. Studies on equimolar mixtures by chemiluminescence and cyclic voltammetry. *Food Chemistry*, 125, 622-629.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101, 492-501.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., & Rémésy, C. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 287-306.
- 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).
- Shanmuganathan, A., Avery, S. V., Willetts, S. A., & Houghton, J.E. (2004). Copper-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* targets enzymes of the glycolytic pathway. *FEBS Letters*, 556, 253-259.
- Shenton, D., & Grant, C. M. (2003). Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 374, 513-519.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Vorm, O., Havlis, J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, 1, 2856-2860.
- Shih, P. H., Yeh, C. T., & Yen, G. C. (2007). Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9427-9435.
- Silva, C. G., Herdeiro, R. S., Mathias, C. J., Panek, A. D., Silveira, C. S., Rodrigues, V. P., Rennó, M. N., Falcão, D. Q., Cerqueira, D. M., Minto, A. B. M., Nogueira, F. L. P., Quaresma, C. H., Silva, J. F. M., Menezes, F. S., & Eleutherio, E. C. A. (2005). Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. *Pharmacological Research*, 52, 229-233.
- Silva, C. G., Raulino, R. J., Cerqueira, D. M., Mannarino, S. C., Pereira, M. D., Panek, A. D., Silva, J. F. M., Menezes, F. S., & Eleutherio, E. C. A. (2009). *In vitro* and *in vivo* determination of antioxidant activity and mode of action of isoquercitrin and Hyptis fasciculata. *Phytomedicine*, 16, 761-767.
- Singleton, V. L. (1982). Grape and wine phenolics; background and prospects. University of California, Davis Grape and Wine Centennial Symposium Proceedings.
- Singleton, V. L., & Esau, P. (1969). Phenolic substances in grapes and wine, and their significance. *Advances in Food Research* (Suppl. 1), 1-282.

- 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.
- Somers, T. C., Verette, E., & Pocock, K. F. (1987). Hydroxycinnamate Esters of *Vitis vinifera*: Changes during White Vinification, and Effects of Exogenous Enzymic Hydrolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 40, 67-78.
- 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.
- Stalmach, A., Edwards, C. A., Wightman, J. D., & Crozier, A. (2012). Gastrointestinal stability and bioavailability of (poly)phenolic compounds following ingestion of Concord grape juice by humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56, 497-509.
- 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.
- Stefenon, C. A., Colombo, M., Bonesi, C. de M., Marzarotto, V., Vanderlinde, R., Salvador, M., & Henriques, J. A. P. (2010). Antioxidant activity of sparkling wines produced by Champenoise and Charmat methods. *Food Chemistry*, 119, 12-18.
- Steinberg, D. (1993). Modified forms of low-density lipoprotein and atherosclerosis. *Journal of Internal Medicine*, 233, 227-232.
- Stervbo, U., Vang, O., & Bonnesen, C. (2007). A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chemistry*, 101, 449-457.
- Stinco, C. M., Baroni, M. V., Di Paola Naranjo, R. D., Wunderlin, D. A., Heredia, F. J., Meléndez-Martínez, A. J., & Vicario, I. M. (2015). Hydrophilic antioxidant compounds in orange juice from different fruit cultivars: Composition and antioxidant activity evaluated by chemical and cellular based (*Saccharomyces cerevisiae*) assays. *Journal of Food Composition and Analysis*, 37, 1-10.
- Sun, J., Liang, F., Bin, Y., Li, P., & Duan, C. (2007). Screening Non-colored Phenolics in Red Wines using Liquid Chromatography/Ultraviolet and Mass Spectrometry/Mass Spectrometry Libraries. *Molecules*, 12, 679-693.
- 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, 599-606.

-
- Talavera, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Gil-Izquierdo, A., Lamaison, J. L., & Remesy, C. (2005). Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3902-3908.
- Talavera, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Lamaison, J. L., & Remesy, C. (2003). Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. *The Journal of Nutrition*, 133, 4178-4182.
- Tanaka, K., Sano, T., Ishizuka, K., Kitta, K., & Kawamura, Y. (1994). Comparison of properties of leaf and root glutathione reductases from spinach. *Plant Physiology*, 91, 353-358.
- Tauchen, J., Marsik, P., Kvasnicova, M., Maghradze, D., Kokoska, L., Vanek, T., & Landa, P. (2015). *In vitro* antioxidant activity and phenolic composition of Georgian, Central and West European wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 41, 113-121.
- Thimothe, J., Bonsi, I. A., Padilla-Zakour, O. I., & Koo, H. (2007). Chemical characterization of red wine grape (*Vitis vinifera* and *Vitis Interspecific Hybrids*) and pomace phenolic extracts and their biological activity against *Streptococcus mutans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10200-10207.
- This, P., Lacombe, T., & Thomas, M. R. (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics*, 22, 511-519.
- Tunstall-Pedoe, H., *et al.* (1988). The world health organization Monica Project (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease): a major international collaboration. *Journal of Clinical Epidemiology*, 41, 105-114.

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.
- Vergara, C., von Baer, D., Mardones, C., Wilkens, A., Wernekinck, K., Damm, A., Macke, S., Gorena, T., & Winterhalter, P. (2012). Stilbene Levels in Grape Cane of Different Cultivars in Southern Chile: Determination by HPLC-DAD-MS/MS Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 929-933.
- Villa-Cuesta, E., Boylan, J. M., Tatar, M., & Gruppuso, P. A. (2011). Resveratrol Inhibits Protein Translation in Hepatic Cells. *PLoS One*, 6, 1-10.
- Vivar-Quintana, A. M., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2002). Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. *Analytica Chimica Acta*, 458, 147-155.

W

- Walker, G. M. & P. V. Dijck. (2006). Physiological and molecular responses of yeasts to the environment, pp. 111-152. En A. Querol and G. Fleet (eds.), *Yeasts in Food and Beverages*. Springer-Verlag, Berlin.

-
- Wek, R. C., Jiang, H. J., & Anthony, T. G. (2006). Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochemical Society Transactions*, 34, 7-11.
- Wilmsen, P. K., Santa Spada, D., & Salvador, M. (2005). Antioxidant activity of the avonoid hesperedin in chemical and biological system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4757-4761.
- Wolfe, K. L., & Liu, R. H. (2007). Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8896-8907.
- 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.
- Wrona, M., Patel, K., & Wardman, P. (2005). Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms towards carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free Radical Biology & Medicine*, 38, 262-270.

X

-
- Xiao, J., Kai, G., Ni, X., Yang, F., & Chen, X. (2011). Interaction of natural polyphenols with α -amylase *in vitro*: molecular property affinity relationship aspect. *Molecular BioSystems*, 7, 1883-1890.

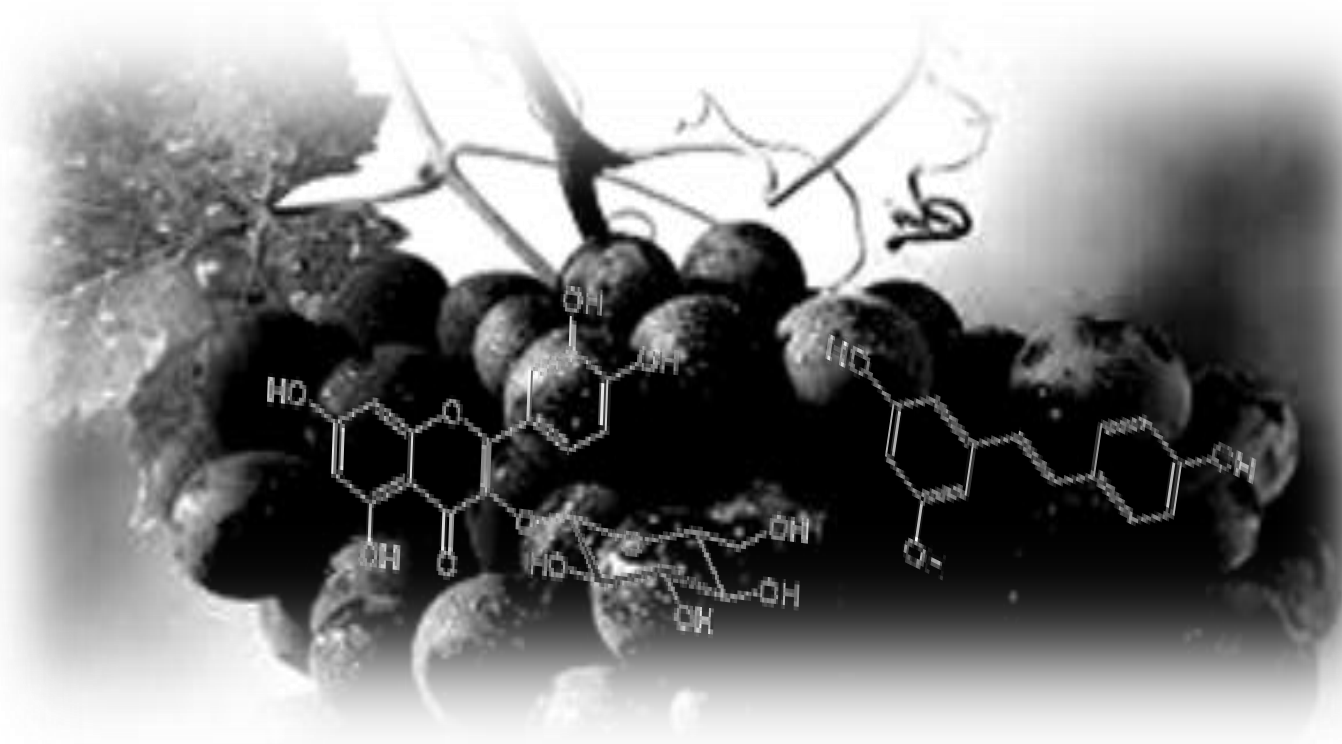
Y

-
- Yamamoto, Y. Y. (2000). Free radicals in chemistry, biology and medicine. UK: OICA International.
- Yang, J., Martinson, T. E., & Liu, R. H. (2009). Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chemistry*, 116, 332-339.
- Yeh, C. T., Ching, L. C., & Yen, G. C. (2009). Inducing gene expression of cardiac antioxidant enzymes by dietary phenolic acids in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20, 163-171.
- Yoshitake, S., Nanri, H., Fernando, M. R., & Minakami, S. (1994). Possible differences in the regenerative roles played by thioltransferase and thioredoxin for oxidatively damaged proteins. *Journal of Biochemistry*, 116, 42-46.

Z

-
- Zhou, X., Liao, W-J., Liao, J-M, Liao, P., & Lu, H. (2015). Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome. *Journal of Molecular Cell Biology*, 7, 92-104.

PUBLICACIONES ORIGINADAS EN ESTA TESIS



Durante la realización de la presente tesis doctoral se publicaron los siguientes trabajos científicos:

1- “*In vivo* antioxidant activity of grape, pomace and wine from three red varieties grown in Argentina: Its relationship to phenolic profile.” **Mariana S. Lingua**, María P. Fabani, Daniel A. Wunderlin, María V. Baroni. *Journal of Functional Foods*. 2016. 20: 332-345.

Se encuentran en proceso de revisión:

1- “From Grape to Wine: Changes in Phenolic Composition and its Influence on Antioxidant Activity”. **Mariana S. Lingua**, María P. Fabani, Daniel A. Wunderlin, María V. Baroni. *Food Chemistry* (Ms. Ref. N°.: FOODCHEM-D-15-02701).

2- “Changes in the phenolic profile of Argentinean grapes due sundrying process to obtain raisins”. María P. Fabani, María V. Baroni, Lorena Luna, **Mariana S. Lingua**, Magdalena V. Monferran, Hector Paños, Alejandro Tapia, Daniel A. Wunderlin, Gabriela Egly Feresin. *Journal of Functional Composition and Analysis* (Ms. Ref. N°.: JFCA-D-15-00811R1).