

PROYECTO FIN DE GRADO (6 ECTS)

Grado en Biotecnología



ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS POLIFENOLES DEL VINO Y SUS APLICACIONES BIOLÓGICO-PREVENTIVAS

Presentado por: **Lourdes Fuente Marín**

Dirigido por: Guillermo Benítez Cruz (UEM) y Dolores González de Llano/
María Victoria Moreno Arribas (CIAL-CSIC)

Villaviciosa de Odón, Junio 2014

TITULO DEL TRABAJO:

Estudio de la Capacidad Antioxidante de los Polifenoles del Vino y sus Aplicaciones Biológico/Preventivas

ABSTRACTO:

Los polifenoles, pertenecen a un amplio grupo de metabolitos secundarios presentes tanto en la uva como el vino. Estos compuestos han suscitado creciente interés científico en los últimos años, potenciado por el descubrimiento de sus propiedades antioxidantes y su papel en la cura de enfermedades como el cáncer, la diabetes de tipo dos, enfermedades cardiovasculares y del sistema nervioso, además de procesos inflamatorios. Para desvelar la relación entre la composición fenólica de un vino y sus efectos sobre salud es necesario cuantificar el contenido fenólico, identificando los diferentes compuestos presentes y sus características, para así poder determinar su efectos tanto como compuestos aislados como en sinergias. Este estudio se ha propuesto analizar la composición fenólica del vino y aquellas propiedades terapéuticas directamente relacionadas con los efectos antioxidantes de los polifenoles. Como parte del trabajo se han testado algunos de los compuestos polifenólicos presentes en el vino para evaluar su capacidad antioxidante e inhibitoria de la citotoxicidad celular, mediante ensayos de especies reactivas de oxígeno y de citotoxicidad empleando bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).

TITLE OF THE RESEARCH PAPER

Antioxidant Properties of Wine Polyphenols and their Biologic/Preventive Usage

ABSTRACT:

Polyphenols, constitute a highly diverse group of secondary metabolites present in both grapes and wine. In recent years, these compounds have incited increasing scientific interest, fuelled by the discovery of their antioxidant properties and the role they play in treating diseases such as cancer, type two diabetes, cardiovascular and nervous system diseases, as well as inflammatory processes. To uncover the relationship between its phenolic composition and the potential effects on health is necessary to quantify the phenolic content of wine, identifying the different compounds and their characteristics, in order to determine the effects they have as isolated compounds as well as in synergies. This study aimed to analyse the phenolic composition of wine and those therapeutic properties directly related to the antioxidant effects of polyphenols. As part of the work, some of the polyphenolic compounds present in wine have been tested with the purpose of evaluating their antioxidant ability and their capacity to inhibit cell cytotoxicity through reactive oxygen species and cytotoxicity using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assays.

1. INTRODUCCIÓN	4
2. POLIFENOLES DEL VINO	4
2.1 COMPOSICIÓN FENÓLICA DEL VINO: CLASIFICACIÓN	5
2.1.1 ÁCIDOS FENÓLICOS	6
2.1.2 FLAVONOIDES	6
2.1.3 TANINOS	8
2.1.4 ESTILBENOS	9
2.2 PROPIEDADES BIOLÓGICO/PREVENTIVAS DE LOS POLIFENOLES	10
2.2.1 POLIFENOLES Y SU EFECTO ANTIINFLAMATORIO	11
2.2.2 POLIFENOLES Y CÁNCER	12
2.2.3 POLIFENOLES Y SU PROTECCION DEL SISTEMA CARDIOVASCULAR	14
2.2.4 POLIFENOLES Y SUS EFECTOS PREVENTIVOS DE LA DIABETES	16
2.2.5 OTROS EFECTOS BENEFICIOSOS DE LOS POLIFENOLES	17
3. OBJETIVOS	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS	18
4.1 MATERIALES	18
4.1.1 COMPUESTOS FENÓLICOS PUROS	18
4.1.2 EXTRACTOS DE UVA	19
4.1.3 CÉLULAS	20
4.1.4 LECTOR DE MICROPLACAS FLUOSTAROPTIMA	20
4.1.5 MICROPLACAS	20
4.1.6 SOLUCIÓN SALINA PBS	21
4.1.7 DMSO	21
4.2 MÉTODOS	21
4.2.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE COMPUESTOS Y EXTRACTOS	21
4.2.2 ENSAYOS	21
4.3 CULTIVOS CELULARES	24
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
6. REFLEXIÓN DIDÁCTICA	30
7. CONCLUSIONES	30
8. BIBLIOGRAFÍA	31
AGRADECIMIENTOS	34
ANEXOS	35

1. INTRODUCCIÓN:

En los últimos años, los polifenoles han suscitado un creciente interés como antioxidantes, debido al papel potencial que podrían jugar en la prevención de un número de enfermedades crónicas tales como enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y la diabetes tipo 2. La compilación de información detallada sobre la naturaleza y las cantidades de polifenoles presentes en los alimentos resulta esencial para el descubrimiento de la asociación entre los polifenoles y la salud humana, así como el impacto relativo de su consumo en la cura de enfermedades.

Los polifenoles son los principales antioxidantes en la dieta, con una ingesta estimada 10 veces superior a la de la vitamina C y 100 veces superior a la de la vitamina E o carotenoides (Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012). El vino es una de las fuentes dietarias de polifenoles con mayor abundancia y diversidad de compuestos fenólicos. Entre estos compuestos se encuentran numerosos ácidos fenólicos y flavonoides que han demostrado tener múltiples aplicaciones terapéuticas principalmente relacionadas con su poder antioxidante y son parcialmente responsables del efecto beneficioso derivado del consumo moderado y regular de vino (Rodrigo, Miranda, & Vergara, 2011).

Descubrir la relación entre la composición fenólica de un vino, su origen, evolución temporal y efectos sobre salud representa un gran desafío para la investigación enológica y biotecnológica del momento.

2. POLIFENOLES DEL VINO

Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas con estructuras químicas muy diversas caracterizadas por presentar más de un grupo fenol. Más de 500 polifenoles se han descrito en alimentos y bebidas comunes (Neveu, et al., 2010). En lo que a este documento respecta, nos concentraremos en la composición fenólica de la uva y su derivado, el vino.

La presencia de polifenoles en la uva y su cantidad están determinadas por muchos factores que pueden ser ambientales, tales como el clima o las condiciones del suelo, o estar relacionados con la variedad y madurez del fruto (Garrido & Borges, 2013). Los polifenoles de la uva no están distribuidos homogéneamente en el fruto si no que se concentran principalmente en las semillas (60%), la piel (30%), y en un menor grado en la pulpa y tallos (menos de 10%).

Los compuestos fenólicos presentes en el producto y su porcentaje proporcionan al vino ciertas características sensoriales como: aroma, color, sabor, amargura o astringencia (Garrido & Borges, 2013).

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

obtienen a partir de uvas tintas o verdes por diferentes métodos de vinificación. Durante la vinificación del vino tinto, el jugo de uva se fermenta de 3 a 21 días en contacto con las partes sólidas de la uva, las cuales presentan mayor concentración de polifenoles y estos se dispersan en el jugo. Sin embargo, durante la vinificación del vino blanco, el zumo se separa de las partes sólidas inmediatamente después de la molienda de la uva. El proceso para el vino rosado es intermedio. Por lo tanto, el contenido de polifenoles será más alto en el vino tinto, más bajo en el vino blanco e intermedio en vinos rosados (Neveu, et al., 2010). El contenido promedio de polifenoles está alrededor de 1150 mg/L en los vinos tintos, 425 mg/L en el caso de los vinos blancos y 820 mg/L en rosados (Cueva, 2011 ; Neveu, et al., 2010).

A continuación, se procederá a estudiar los polifenoles mas abundantes en el vino, su composición química y sus propiedades terapéuticas.

2.1 COMPOSICIÓN FENÓLICA DEL VINO: CLASIFICACIÓN

Los polifenoles son compuestos fenólicos derivados de la estructura química del fenol (Figura 1). Los polifenoles se caracterizan por la presencia de al menos un grupo aromático y una sustitución hidroxilo como mínimo, que puede estar libre o formando parte de otra función: éter, éster o heterósido (Bruneton, 1993). La gran diversidad química de esta familia se debe a que estos compuestos fenólicos existen tanto en su forma libre como en su forma conjugada. Además pueden estar unidos a ácido quínico, así como a una o más moléculas de un azúcar (glucosa, galactosa, sacarosa y manosa) formando di-tri- o incluso tetraglucósidos (Cheynier, Scheider, Salmon, & Fulcrand, 2010).

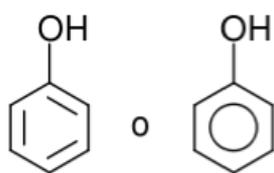


Figura 1: Estructura química del fenol

Estimando su importancia por orden decreciente de abundancia, los polifenoles más relevantes que aparecen en el vino son ácidos fenólicos, estilbenos, flavonoles, dihidroflavonoles, antocianinas, monómeros de flavanoles (catequinas) y polímeros de flavanoles (proantocianidinas). Estos compuestos no están distribuidos de manera uniforme en el fruto. Los ácidos fenólicos están presentes principalmente en la pulpa, antocianinas y estilbenos en la piel, y otros polifenoles (catequinas, proantocianidinas y flavonoles) en la piel y las semillas (Neveu, et al., 2010).

La proporción de los diferentes polifenoles presentes en los vinos dependerá del tipo de vinificación. Dado que el proceso de vinificación del vino tinto se realiza en presencia de todos los componentes de la uva, un vino tinto será más rico en aquellos polifenoles abundantes en la piel y las semillas. Por comparación, al realizarse la vinificación del vino blanco habiendo retirado los componentes sólidos de la uva, los polifenoles presentes en el vino blanco se originarán principalmente de la pulpa. Los principales polifenoles presentes en el vino blanco serán, por tanto, los ácidos fenólicos, junto con menores cantidades de catequinas y estilbenos. El vino tinto contendrá pigmentos antocianinas, proantocianidinas como principales polifenoles, junto con flavonoles y otros polifenoles presentes en el vino blanco (Neveu, et al., 2010).

2.1.1 Ácidos fenólicos:

La denominación ácido fenólico se aplica a todos los compuestos orgánicos que poseen como mínimo una función carboxílica y un hidroxilo fenólico (Bruneton, 1993). Los ácidos fenólicos existen de forma predominante como ácidos hidroxibenzoicos, que contienen 7 átomos de carbono, y hidroxicinámicos, que contienen 9 átomos de carbono. Ambos están presentes tanto en la uva como en el vino. El vino tinto contiene 9,63 mg/100 ml ácidos hidroxicinámicos y 7,02 mg/100 ml ácidos hidroxibenzoicos. El vino blanco 2,84 mg/100 ml ácidos hidroxicinámicos y 2,49 mg/100 ml ácidos hidroxibenzoico. Como representantes más importantes de ácidos hidroxibenzoicos se pueden citar los ácidos protocatéquico, vanílico y gálico. Al grupo de ácidos hidroxicinámicos pertenecen los ácidos para-cumarico, caféico y felúrico (Neveu, et al., 2010).

Los ácidos hidroxicinámicos son los compuestos fenólicos más característicos de los vinos blancos y los principales compuestos no flavonoides de vinos tintos (Garrido & Borges, 2013). A pesar de que los vinos blancos contienen una baja concentración de compuestos fenólicos comparados con los vinos tintos, estos contienen comparativamente una concentración alta de ácidos hidroxicinámicos. Los ácidos hidroxicinámicos son por tanto la clase predominante de fenoles en los vinos blancos y la clase principal de fenoles no flavonoides en vinos tintos (Vanzo, Cecotti, Vrhovsek, Torres, Mattivi, & Passamonti, 2007).

2.1.2 Flavonoides:

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

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

compuestos están presentes en la piel y en las semillas de la uva, así como en el vino. El vino contiene flavanoles, incluyendo proantocianidinas (polímeros) y catequinas (monómeros). Las proantocianidinas (29,4 mg/100 ml estimados por HPLC en fase directa) y monómeros de flavanoles (11,5 mg/100 ml) son particularmente abundantes en el vino tinto. Están presentes en menor cantidad en el vino rosado y vino blanco (respectivamente 1,7 y 2,0 mg/100 ml) (Neveu, et al., 2010).

Los principales monómeros de flavanoles son (+)-catequina (6,8 mg/100 ml en vino tinto y 1,0 mg/100 ml en vino blanco) y su enantiomero la (-)-epicatequina (3,8 mg/100 ml en vino tinto y 0,9 mg/100 ml en vino blanco).

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

Los flavonoles siguen a los flavanoles como los flavonoides más abundantes en el vino. El vino tinto y el vino blanco contienen respectivamente, 6,98 y 0,48 mg/100 ml de flavonoles. Los principales flavonoides son en orden decreciente de abundancia, la quercetina, miricetina, isorhamnetina y kaempferol. Los principales flavonoles en el vino tinto son quercetina 3-O-ramnósido (1,16 mg/100 ml) y la quercetina 3-O-glucósido (1,14 mg/100 ml) (Neveu, et al., 2010). Sin embargo, en el vino blanco, se han detectado exclusivamente quercetina, isorhamnetina y kaempferol. Ningún otro flavonol ha aparecido en las variedades estudiadas de vino blanco (Garrido & Borges, 2013). No se han encontrado datos referentes al contenido de flavonoides para el vino rosado.

También dentro del grupo de los flavonoides, se clasifica a las antocianinas. Las cuales tienen especial relevancia dentro del proceso de envejecimiento del vino. Las antocianidinas son pigmentos solubles responsables del color de la uva y del vino y se encuentran principalmente en la piel de la uva (He, et al., 2010). Se han detectado más de 60 antocianinas en los vinos tintos (Heier, Blaas, Dross, & Wittkowski, 2002). Las antocianinas se detectan en niveles elevados en vinos tintos (22,7 mg/100 ml). Están ausentes o presentes en forma de trazas en vinos blancos (0,04 mg/100 ml) (Neveu, et al., 2010).

Las antocianinas en el vino son libres (agliconas) o glucosiladas. Derivan de cinco antocianidinas: malvidina (de color rojo azulado y 70% de antocianidinas totales), petunidina (rojo azulado), peonidina (rojo), delphinidina (rojo azulado), cianidina (rojo anaranjado) (Neveu, et al., 2010 ; Heier, Blaas, Dross, & Wittkowski, 2002). Las antocianinas reaccionan con catequinas, proantocianidinas y otros componentes del vino durante el envejecimiento del vino para formar nuevos pigmentos poliméricos que resultan en la modificación del color del vino y una baja astringencia. (Cheynier, et al., 2006). Estos pigmentos complejos son diversos en estructura y están presentes en el vino en cantidades muy bajas, lo que dificulta su cuantificación (Neveu, et al., 2010).

2.1.3 Taninos:

Los taninos son compuestos polifenólicos que muestran propiedades astringentes las cuales participan en el proceso de precipitación de proteínas. Normalmente se dividen en dos clases: taninos hidrolizables y taninos no hidrolizables o condensados. Los taninos naturales presentes en uvas y vino, son predominantemente del tipo condensado (Neveu, et al., 2010).

En vinos jóvenes, los taninos aparecen principalmente en forma de dímeros o trímeros. Sin embargo, la concentración de estas especies oligoméricas disminuye durante el envejecimiento del vino debido a procesos de oxidación y precipitación (Cheynier, et al., 2006).

Taninos hidrolizables:

Los taninos hidrolizables son polifenoles complejos que pueden ser degradados mediante cambios en el pH, así como reacciones de hidrólisis tanto enzimática como no enzimática. El resultado de estas operaciones son azúcares y ácidos fenólicos (Garrido & Borges, 2013).

Los taninos hidrolizables son oligo- o poliésteres de un azúcar con un número de moléculas de ácido fenólico variable. El azúcar normalmente es la glucosa y el ácido es el ácido gálico (en el caso de taninos gálicos) o el ácido hexahidroxidifénico (HHDP) y sus derivados de oxidación (en el caso de los taninos elágicos) (Bruneton, 1993).

Taninos condensados o proantocianidinas:

Los taninos condensados o proantocianidinas poliméricas son precursores de las antocianidinas. Se han encontrado en cantidades residuales en los componentes sólidos de la uva (e.j: piel, semillas) así como en la pulpa. La cantidad de proantocianidina, su estructura y grado de polimerización dependerán de su localización en los tejidos de la uva. Estos compuestos se transfieren al mosto durante el proceso de vinificación (molienda, maceración y fermentación) (Linskens & Jackson, 1988). Las plantas producen los proantocianidinas en respuesta al estrés ambiental y a infecciones por bacterias (Esteban Fernandez, 2013).

Las proantocianidinas son moléculas de alto peso molecular que generalmente aparecen como oligómeros y polímeros de flavan-3-oles ligados entre sí por enlaces carbono-carbono (Esteban Fernandez, 2013).

Los flavan-3-oles son producto del metabolismo de los flavonoides, se forman por hidroxilación en posición 3 de una flavanona. Entre los flavan-3-oles más frecuentes se pueden encontrar catecol, el epicatecol, el galocatecol y el epigallocatecol, aunque los más representativos de este grupo con la (+)catequina y la (-)epicatequina (Lunte, Blankenship, & Read, 1988).

La identificación y el estudio de las propiedades físico-químicas de las proantocianidinas constituye un sujeto de investigación relevante en el campo de la enología, dado que estos compuestos son principalmente responsables de las características sensoriales del vino (color, sabor, astringen-

gencia y amargura) y juegan un papel esencial en el proceso de envejecimiento del vino debido a sus propiedades de oxidación, condensación y polimerización(Garrido & Borges, 2013).

2.1.4 Estilbenos:

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

El Resveratrol es el estilbeno más representativo. Recientemente, el resveratrol ha recibido mucha atención por sus propiedades biológicas específicas y sus efectos terapéuticos potenciales. El vino es la fuente dietética principal de resveratrol. Este compuesto se produce en las hojas y en la piel de las uvas en respuesta a una infección o a un estrés inducido por herbicidas, fungicidas o luz UV. El resveratrol se encuentra como aglicón (trans - y cis - resveratrol), o como glucósido (trans-y cis - piceído) y en formas diméricas (viniferin y pallidol)(Baur & Sinclair, 2006).

Se sabe que el contenido de resveratrol en la uva disminuye considerablemente durante la maduración del fruto. En el vino, el resveratrol está presente sólo a nivel de trazas, su concentración exacta dependerá altamente de la técnica enológica utilizada en su vinificación(Garrido & Borges, 2013). El contenido en los vinos tintos es aproximadamente 10 veces menor que en los vinos blancos. Valores de contenido de resveratrol y su 3 -O- glucósido son, respectivamente, 0,28 y 0,62 mg/100 ml en el vino tinto , 0,12 y 0,20 mg/100 ml de vino rosado , y 0,04 mg/100 mg/100 ml y 0,25 en el vino blanco (Neveu, et al., 2010).

Durante el proceso de vinificación la molécula de resveratrol se isomeriza a trans-resveratrol y por ello este isómero se encuentra con menor concentración en la uva. De acuerdo con el tipo de vino, la forma trans del resveratrol (aglicona o glucósido) es por lo general, pero no siempre, ligeramente más abundante que la forma cis (Neveu, et al., 2010).

En los últimos años la presencia de estilbenos en el vino se ha convertido en un tema de investigación recurrente con el objetivo de descubrir la correlación entre sus perfiles y los procesos de fabricación de vino con las diferentes variedades de uva. Esto se debe, principalmente, a la evidencia recopilada sobre sus posibilidades terapéuticas.

Refiérase al Anexo 1 de este trabajo para encontrar las figuras correspondientes a las estructuras químicas de los compuesto mencionados en el apartado 2 y sub-apartados.

2.2 PROPIEDADES BIOLÓGICO/PREVENTIVAS DE LOS POLIFENOLES

Los compuestos fenólicos son sintetizados exclusivamente por vegetales y microorganismos. Por lo tanto, los organismos animales sólo pueden obtenerlos mediante la alimentación o a través de

una simbiosis, elaborando metabolitos (Bruneton, 1993). En los últimos años, debido al descubrimiento de varias propiedades preventivas atribuibles a los polifenoles, el interés científico en estos compuestos ha incrementado considerablemente (Neveu, et al., 2010).

Este trabajo se ha centrado en describir las propiedades biológico/preventivas de los componentes fenólicos de la uva, en concreto, de su derivado el vino. La presencia de etanol en el vino ayuda a la absorción de los polifenoles, contribuyendo así a su biodisponibilidad. Antes de su absorción los polifenoles serán hidrolizados por las enzimas intestinales y la microflora del colon. Después, se someterán a procesos de metabolismo en el intestino y en el hígado (Rodrigo, Miranda, & Vergara, 2011). Numerosos estudios han demostrado que el consumo moderado de vino aporta una gran variedad de beneficios para nuestra salud, atribuidos a la presencia de polifenoles (Nadtochiy & Redman, 2011).

Compuestos fenólicos como la quercetina, el resveratrol o la catequina son potentes antioxidantes que previenen el daño provocado por numerosas enfermedades como cáncer, asma, alergias, osteoporosis, diabetes tipo 2, artritis y enfermedades cardiovasculares (Nadtochiy & Redman, 2011) (Rodrigo, Miranda, & Vergara, 2011). Estas propiedades terapéuticas se asocian, principalmente, a la actividad antioxidante que poseen muchos polifenoles, provocando efectos vasodilatadores, antitrombóticos, anti-inflamatorios y anti-apoptóticos (Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012).

Dentro de los incluidos bajo la denominación “efectos antioxidantes”, los polifenoles poseen un gran abanico de aplicaciones biológico/preventivas que derivan de la cantidad y variedad de sus acciones biológicas, entre las que se encuentran: eliminación de radicales libres, quelación de metales, modulación enzimática, modulación de vías de señalización celular y efectos sobre la expresión de genes (Rodrigo, Miranda, & Vergara, 2011).

Los flavonoides como la catequina y la quercetina neutralizan directamente las especies reactivas de oxígeno (ROS). La quercetina, la miricetina y el kenferol son los flavonoides que más actividad neutralizadora de radicales libres presentan. Actúan capturando los electrones desapareados de las ROS generando especies menos reactivas. Además, la quercetina puede quelar iones metálicos de transición como el hierro o el cobre, evitando la formación de las ROS. Los polifenoles también son capaces de inhibir las enzimas generadoras de ROS, como la xantina oxidasa y la nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa (Korkina & Afanas'ev, 1997).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son sintetizadas mediante la reducción parcial de oxígeno como resultado del metabolismo celular. Están involucradas en procesos fisiológicos como el ciclo y la muerte celular, la proliferación celular y la transducción de señales. Aun así las especies ROS, al ser muy reactivas, son responsables de la oxidación de lípidos, proteínas y ADN causando daño en tejidos vitales. La alta concentración de estas sustancias ocurre cuando

no existe un balance entre su producción y la habilidad de las defensas antioxidantes para eliminarlas. El resultado es una condición denominada estrés oxidativo que está asociada con numerosas enfermedades degenerativas severas (García-Nebot, Recio, & Hernandez-Ledesma, 2014).

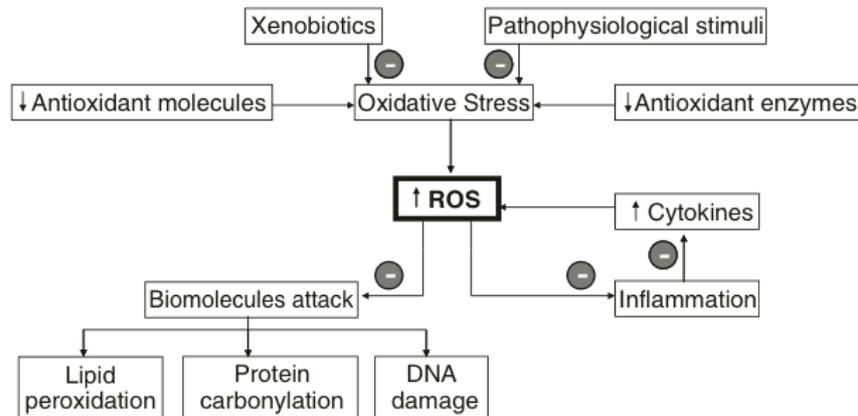


Figura 2: Sitios de acción de los polifenoles frente a las biomoléculas ROS. representa la vías contrarrestadas por lo polifenoles. Fuente: (Rodrigo, Miranda, & Vergara, 2011)

Dado que el estrés oxidativo constituye el elemento unificante del daño que producen varios tipos de enfermedades, se puede entender como los compuestos fenólicos antioxidantes podrían tener un efecto beneficioso.

2.2.1 Polifenoles y su efecto antiinflamatorio

Los compuestos fenólicos han demostrado efectos anti-inflamatorios en modelos con ratas, ratones y humanos (Rodrigo, Miranda, & Vergara, 2011). Esta acción anti-inflamatoria se atribuye a sus propiedades antioxidantes en conjunto con su capacidad para modular el sistema inmune actuando como inhibidores enzimáticos, de mediadores proinflamatorios y de la migración celular (Rodrigo, Miranda, & Vergara, 2011).

Durante el proceso inflamatorio tienen lugar una serie de eventos de síntesis y liberación de mediadores proinflamatorios, que incluyen las citoquinas, las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el óxido nítrico (NO). Como resultado se produce la ruptura de la membrana epitelial y un daño tisular excesivo. La llave para que se desencadene esta respuesta inflamatoria es el factor de transcripción NF- κ B, que induce la expresión de genes pro-inflamatorios y regula la liberación de citoquinas y quimiocinas (Nunes, et al., 2013).

Mediadores inflamatorios como las citoquinas o la histamina actúan como inductores del proceso inflamatorio mediante el reclutamiento de células como los monocitos, neutrófilos y leucocitos. Son, por lo tanto, responsables de procesos de migración celular. Se ha demostrado que los po-

lifenoles actúan sobre la producción de citoquinas mediante la inhibición del factor NF- κ B, inductor de los genes proinflamatorios que codifican por estos mediadores(Nunes, et al., 2013). El NO también juega un papel importante como modulador celular, actuando en procesos tanto patológicos como fisiológicos (Nunes, et al., 2013). El NO está inhibido por la acción de polifenoles del tipo proantocianidinas (Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012).

Otro elemento importante en la cascada de inflamación es la familia de enzimas ciclooxigenasas (COX) cuya concentración aumenta por acción del estrés oxidativo. La enzima COX-1 mantiene las condiciones normales fisiológicas; la enzima COX-2 es activada por citoquinas pro-inflamatorias y está involucrada en la síntesis de prostaglandinas como señales inflamatorias que provocan daño oxidativo en el tejido(Nunes, et al., 2013). Se ha demostrado que los polifenoles, especialmente la quercetina, inhiben las enzimas COX. La inhibición de COX, en particular de la COX-2 evita el crecimiento de células tumorales, su proliferación, angiogénesis y metástasis, además de inflamación y apoptosis (Araújo, Gonçalves, & Martel, 2011). Se ha demostrado que el resveratrol participa en la inhibición de prostaglandinas, evitando la generación de señales infamatorias por la enzima COX-2(Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012).

De lo anterior se puede deducir que la presencia en el vino de polifenoles como antocianos, catequinas, proantocianidinas, taninos condensados y estilbenos proporcionan al vino su poder anti-inflamatorio (Angel-Morales, Noratto, & Mertens-Talcott, 2012) .

Por lo tanto, en este caso, el papel antioxidante de los polifenoles se traduce en su poder para actuar como reguladores de cascadas de señalización celular y su labor como supresores de enzimas. La forma de control más importante es la modulación del factor NF- κ B lo que permite a los polifenoles actuar a múltiples niveles (Nunes, et al., 2013).

2.2.2 Polifenoles y cáncer

La carcinogénesis es un proceso que consta de múltiples fases donde numerosas alteraciones moleculares o celulares pueden ocurrir, en especial las de origen genético (Rodrigo, Miranda, & Vergara, 2011). Existen pruebas fehacientes de que los polifenoles interfieren en la iniciación, promoción y progresión del cáncer, actuando como agentes quimio-preventivos. Los compuesto fenólicos como la quercetina, miricetina, epicatequina, catequina y resveratrol inhiben el crecimiento celular a través de la inducción del arresto del ciclo celular, y/o la apoptosis e inhiben la proliferación, angiogenesis y/o metástasis. Estos efectos están involucrados en múltiples mecanismos moleculares y Bioquímicos los cuales aún no han sido completamente caracterizados y requieren de mayor y mejor estudio (Araújo, Gonçalves, & Martel, 2011).

En Ramos (2008) se señalan los 6 efectos quimio-preventivos más comunes que los polifenoles tendrán en las células cancerígenas son: (1) efecto antioxidante, (2) efecto anti-inflamatorio, (3) efecto negativos en supervivencia y proliferación celular, (4) arresto del ciclo celular, (5) inducción de apoptosis, (6) efectos anti-angiogénicos y anti-metastásicos.

Dado que los efectos antioxidantes y anti-inflamatorios de los polifenoles se han visto anteriormente en este trabajo, a continuación se procederá al análisis de los efectos restantes.

- *Efectos en la supervivencia y proliferación celular*

Uno de los estudios más representativos sobre la habilidad de los polifenoles para inhibir la proliferación celular fue realizado por Kuntz et al. (1999). De los 36 polifenoles testados, 30 demostraron clara actividad anti-proliferante en la ausencia de citotoxicidad celular en células humanas de cáncer de colon. Una de las vías de señalización más importantes que regulan la proliferación y supervivencia de las células está relacionada con el factor NF- κ B. El factor NF- κ B y su activación son comunes y observables en los procesos cancerígenos. La inhibición de su activación es un objetivo esencial de la quimo-prevención.

- *Arresto del ciclo celular*

La desregulación del ciclo celular es una característica del desarrollo del cáncer. El ciclo celular es un proceso altamente regulado y cualquier alteración de este puede afectar al crecimiento y proliferación de las células cancerígenas. La fase G1/S y G2/M del ciclo celular son dianas importantes para la actuación de los polifenoles (Ramos, 2007).

- *Inducción de la apoptosis*

La muerte celular programada es un mecanismo protector frente al cáncer, que consiste en eliminar las células que han sufrido una alteración en su genoma. La resistencia a este proceso es otra característica del cáncer (Araújo, Gonçalves, & Martel, 2011).

Una de las principales dianas de los polifenoles para inducir apoptosis es la ruta de la proteína quinasa activada por mitógenos (mitogen-activated protein kinase, MAPK). Los mitógenos son moléculas que se encargan de activar las células linfoides tanto de tipo T como B. Otra ruta de apoptosis sobre la que actúan los extractos de uva es la del fosfatidínoditol 3-quinasa-AKT, reduciendo la transcripción de AKT y favoreciendo la degradación del proteosoma (Rodrigo, Miranda, & Vergara, 2011)

- *Efectos anti-angiogénicos y anti-metastásicos*

La angiogénesis es la formación y crecimiento de nuevos vasos capilares a partir de otros vasos ya formados. Es una etapa clave en el crecimiento de tumores, invasión, metástasis.

En Araújo, Gonçalves y Martel (2011) se estudian los efectos quimio-preventivos celulares y moleculares de algunos de los polifenoles con más alta representación en la dieta humana, en células de cáncer colorrectal. De sus conclusiones se deduce que los efectos anti-angiogénicos y anti-metastásicos derivan de su capacidad para inhibir la proliferación celular, crecimientos celulares anormales y apoptosis. Además de los efectos anti-inflamatorios, de supresión de enzimas,

mencionados anteriormente en este trabajo. Dado que los efectos quimio-preventivos de los polifenoles dependen del compuesto seleccionado, su concentración, la duración del tratamiento, y el tipo de célula estudiada, la precaución es esencial al generalizar las observaciones obtenidas en el estudio de Araújo, Gonçalves y Martel (2011).

El compuesto fenólico que más se ha estudiado como tratamiento del cáncer es el resveratrol, que ha mostrado inhibición de la iniciación del tumor y su progresión. Se ha demostrado que actúa a muchos niveles, de forma que puede controlar el ciclo celular así como reducir procesos de inflamación (Rodrigo, Miranda, & Vergara, 2011).

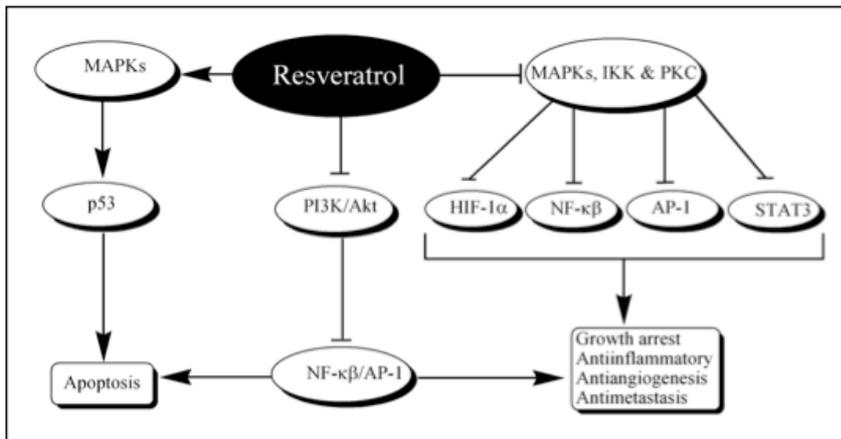


Figura 3: Efecto del resveratrol en vías de transducción de señal intracelulares implicadas en el cáncer (Bishayee, 2009).

En el caso de los efectos anti-cancerígenos de los polifenoles, su papel antioxidante se traduce en la capacidad de modular diferentes procesos celulares en las células cancerígenas actuando como agentes quimio-preventivos de bloqueo y/o agentes quimio-preventivos supresores.

2.2.3 Polifenoles y su protección del sistema cardiovascular

El estrés oxidativo, la inflamación, y en especial la disfunción endotelial juegan un papel clave en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares(Leifert & Abeywardena, 2008).

El consumo moderado de vino ha sido asociado con un descenso del riesgo de desarrollar enfermedades coronarias. Los polifenoles juegan un papel en la homeostasis del sistema cardiovascular, a través de la reducción del estrés oxidativo en la inflamación, ambos procesos claves implicados en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares. Los polifenoles actúan en múltiples niveles en el sistema cardiovascular, incluyendo la función endotelial, la aterosclerosis, agregación plaquetaria y sucesos isquémicos(Nadtochiy & Redman, 2011).

- Efectos de los polifenoles sobre la disfunción endotelial

La disfunción endotelial es esencial en el desarrollo de hipertensión, aterosclerosis y accidentes cerebro-vasculares. Las especies reactivas de oxígeno contribuyen a la disfunción y remodelación

vascular a través de daños oxidativos. Como consecuencia del estrés oxidativo, la reducida biodisponibilidad vascular de óxido nítrico (NO), un agente vasodilatador, genera vasoconstricción e incrementa la presión sanguínea. Se ha observado que la quercetina tiene un efecto reductor de la presión sanguínea y puede mejorar la función endotelial modulando las concentraciones en circulación de productos de NO (Rodrigo, Miranda, & Vergara, 2011). Los polifenoles también tienen la capacidad de favorecer la conversión *in vivo* de NO₂ a NO activando las vías de protección mediadas por este factor (Nadtochiy & Redman, 2011).

- *Efectos de los polifenoles sobre la aterosclerosis*

Por otro lado, la aterosclerosis es una patología caracterizada por la disfunción endotelial y la proliferación así como la migración de las células del músculo liso de los vasos sanguíneos (Nadtochiy & Redman, 2011). Como consecuencia de este proceso inflamatorio se produce el estrechamiento del diámetro del vaso. La administración de zumo de uva y vino atenúan el desarrollo de esta lesión. Se ha demostrado que el vino tinto reduce el estrés oxidativo producido por esta lesión y además aumenta la concentración del colesterol HDL, el cual disminuye el riesgo de enfermedad coronaria (Rodrigo, Miranda, & Vergara, 2011).

- *Efectos de los polifenoles sobre la agregación plaquetaria*

La protección de los polifenoles también incluye la inhibición de la agregación plaquetaria. Se ha probado que los polifenoles pueden llegar a tener el mismo efecto antiplaquetario que otros tratamientos como la aspirina, y por ende presentan efectos beneficiosos para el sistema cardiovascular. El vino tinto tiene más poder antiplaquetario que el vino blanco (Leifert & Abeywardena, 2008).

- *Efectos de los polifenoles sobre los sucesos isquémicos*

Recientes estudios experimentales realizados en animales han demostrado el efecto protector de los polifenoles contra sucesos esquemáticos inducidos experimentalmente en los sujetos. Los polifenoles procedentes tanto de la uva como del vino han demostrado ser capaces de reducir la mortalidad y la severidad de la arritmia cardíaca después de un suceso isquémico. Las proantocianidinas reducen los infartos y mejoran la recuperación tras el suceso. Y un consumo regular ha demostrado reducir la incidencia de los sucesos. Similarmente, el resveratrol también ha mostrado ser efectivo en el tratamiento y recuperación de infartos de miocardio (Leifert & Abeywardena, 2008).

- *Otros efectos de los polifenoles sobre el sistema cardiovascular*

El consumo de vino está asociado con el descenso de la concentración de marcadores inflamatorios como la proteína C-reactiva y la interleucina-6. Los compuestos polifenólicos como la quercetina, la catequina o el resveratrol son potentes antioxidantes cuyo mecanismo de protección consiste en la inhibición del estrés oxidativo. La quercetina está asociada con la activación de la

manganeso superóxido-dismutasa de forma que se preserve la función mitocondrial. Por otro lado, el resveratrol tiene un amplio número de vías por las que puede ser beneficioso para el sistema cardiovascular (Nadtochiy & Redman, 2011). La Figura 4 muestra las múltiples dianas del resveratrol en las enfermedades cardiovasculares.

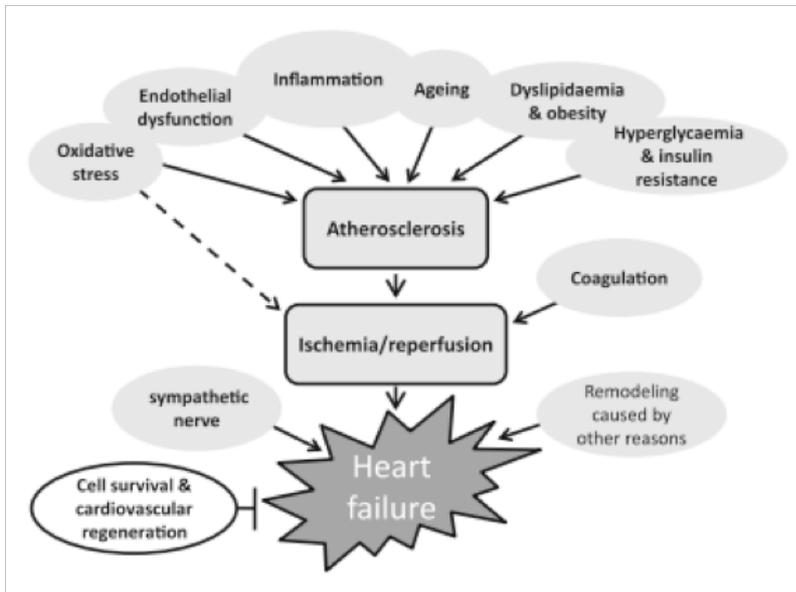


Figura 4: Vías biológico/preventivas del resveratrol (Jeng-Feng, et al., 2011)

El resveratrol tiene un papel muy importante manteniendo la homeostasis del sistema cardiovascular. Los factores coloreados de gris son de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. El resveratrol es capaz de interrumpir estos factores para prevenir o ralentizar el desarrollo de este tipo de enfermedades. Por otro lado, el resveratrol prolonga la supervivencia de las células del miocardio (cuando este está dañado), favorece el proceso de angiogénesis en condiciones post-isquémicas y la proliferación y diferenciación de las células madre cardíacas. De esta forma, se recupera la función cardíaca tras un episodio isquémico.

2.2.4 Polifenoles y sus efectos preventivos de la diabetes

Los efectos beneficiosos que aportan los polifenoles en relación con la diabetes tienen que ver con la disminución que provocan del estrés oxidativo. En efecto, el aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) es el principal estímulo para el desarrollo de resistencia a la insulina (Houstis, Rosen, & Lander, 2006)

Algunos polifenoles, como resveratrol, miricetina y quecertina han mostrado protección frente a cambios oxidativos actuando de forma individual. Por otro lado, se han observado efectos sinérgicos entre el resveratrol combinado con quercetina y pterostilbeno (estilbeno relacionado químicamente con el resveratrol). El ácido felúrico, un ácido fenólico hidroxicinámico, también presenta efectos beneficiosos en relación con la diabetes disminuyendo la glucosa en sangre (Mikstacka, Rimando, & Ignatowicz, 2010).

Unos de los mecanismos propuestos para la acción antidiabética de los polifenoles, en particular del resveratrol, es la modulación de SIRT1. SIRT1 forma parte de una familia de genes que codifican por las enzimas sirtuinas las cuales presentan actividad deacetilasa. SIRT1 está implicada en procesos patológicos como diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares y procesos neurodegenerativos. En el caso específico de la diabetes, además de su acción como modulador de SIRT1, el resveratrol disminuye la secreción de insulina y retarda la aparición de la resistencia a la insulina (Milne, et al., 2007).

2.2.5 Otros efectos beneficiosos de los polifenoles

Polifenoles y sus beneficios para el sistema nervioso

Recientemente se han descrito propiedades beneficiosas del resveratrol para el sistema nervioso. Este compuesto actúa como antioxidante evitando la formación de sustancias tóxicas para las neuronas, además de cómo regulador de la activación de la sirturina SIRT1. Los modelos tanto “*in vivo*” como “*in vitro*” han demostrado que el resveratrol no es sólo eficaz frente al Alzheimer, sino que también frente el Parkinson, Huntington y epilepsia (Albani, Polito, Signorini, & Forloni, 2010).

Polifenoles y su efecto anti-envejecimiento

Gracias a su actividad antioxidante y a su capacidad para eliminar radicales libres, los polifenoles pueden prevenir el daño tisular generado por el estrés oxidativo. Balu et al. (2005, 2006) mostraron como la suplementación alimenticia con extractos de semilla de uva inhibe la acumulación de daños oxidativos del ADN, relacionados con el envejecimiento, y una reducción de la incidencia de la peroxidación lipídica inducida por radicales libres en el sistema nervioso central de ratas adultas.

El resveratrol es un candidato potencial para prevenir el estrés oxidativo inducido por el envejecimiento mediante el incremento de la expresión del regulador de silenciamiento de genes SIRT1 (Kao, et al., 2010).

Polifenoles y su efecto antimicrobiano

Los polifenoles han demostrado efectos antibacterianos, antifúngicos y antivirales (Nadtochiy & Redman, 2011). Esta propiedad de los polifenoles resulta más útil en el campo de la alimentación que en el campo medicinal. Los polifenoles presentes en el vino tinto son los principales que tienen poder antimicrobiano, aunque se han encontrado algunos del vino blanco que inhiben la actividad de ciertos patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* (Papadopoulou, Soulti, & Roussis, 2005).

Otras especies como *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes* son inhibidas por los polifenoles. El patógeno más afectado por estos compuestos es el *S. aureus*, seguido de *E. coli* y *C. albicans*. Así mismo, se ha visto que los extractos del hollejo de la uva tienen un fuerte efecto antimicrobiano frente *Helicobacter pylori*. En particular, el resveratrol ha demostrado ser especialmente efectivo como antifúngico contra *C. albicans*. (Rodrigo, Miranda, & Vergara, 2011).

3. OBJETIVOS

1. Estudiar la composición fenólica del vino y las propiedades biológicas/preventivas de estos compuestos, en especial aquellas directamente relacionadas con las propiedades antioxidantes de los polifenoles del vino.

2. Testar algunos de los compuestos polifenólicos presentes en el vino para evaluar su capacidad antioxidante e inhibitoria de la citotoxicidad celular:

- | | |
|---------------------------|------------------------|
| - (+) catequina | - Ácido protocatéquico |
| - (-) epicatequina | - Ácido clorogénico |
| - Quercetina | - Ácido felúrico |
| - Ácido cafeico | - Aldehído conferílico |
| - Aldehído protocatéquico | - Ácido p-cumárico |

3. Evaluar los efectos de estos compuestos en células adherentes epiteliales de colon tumorales HT29TM, mediante ensayos de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de citotoxicidad (MTT).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1. Compuestos fenólicos puros

Se han ensayado 10 compuestos fenólicos puros:

- | | |
|----------------------------|-------------------------|
| 1. (+) catequina | 6. Ácido protocatéquico |
| 2. (-) epicatequina | 7. Ácido clorogénico |
| 3. Quercetina | 8. Ácido felúrico |
| 4. Ácido cafeico | 9. Aldehído conferílico |
| 5. Aldehído protocatéquico | 10. Ácido p-cumárico |

La Quercetina, aldehído protocatéquico, ácido felúrico y ácido p-cumárico fueron proporcionados por la casa comercial Fluka A.G. (Buchs SG. Switzerland). La (+)catequina, (-)epicatequina y el ácido caféico fueron proporcionados por la casa comercial Sigma (St Louis, MO). Los ácidos protocatéquico, clorogénico y coniférico fueron suministrados por la casa comercial Aldrich (Milwaukee, WI).

4.1.2 Extractos de uva

Se ensayaron 3 extractos polifenólicos de distinto origen y composición, según se describe en la Tabla:

Tabla 1: Características principales de los extractos polifenólicos empleados en este estudio.

EXTRACTO POLIFENÓLICO	PROVEEDOR	POLIFENOLES TOTALES (mg ácido gálico/g)	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (ORAC, mmol Trolox/g)	DISTRIBUCIÓN DE FLAVAN-3-OLES*	
				% Monómeros	% Procianidinas
Vitaflavan®, obtenido de pepita de uva	DRT, S.A. (Francia)	629	21,4	20	80
Eminol®, obtenido de orujos de uva tinta	ABROBIOTEC	33,8	1,43	-	-
Provinols®, obtenido de vino tinto	Safic-Alcan Especialidades, S.A.U. (Barcelona)	474	14,5	-	-

La composición del extracto de pepita de uva Vitaflavan® es de monómeros de flavan-3-oles, procianidinas diméricas y triméricas; así como procianidinas poliméricas (Goodrich, et al., 2012) (Goodrich, et al., 2012) (Goodrich, et al., 2012). Los flavan-3-oles más predominantes en el vitaflavan® son: (+)catequina, (-)epicatequina, procianidina B2 y procianidina C1 (Goodrich, et al., 2012) (Goodrich, et al., 2012) (Goodrich, et al., 2012).

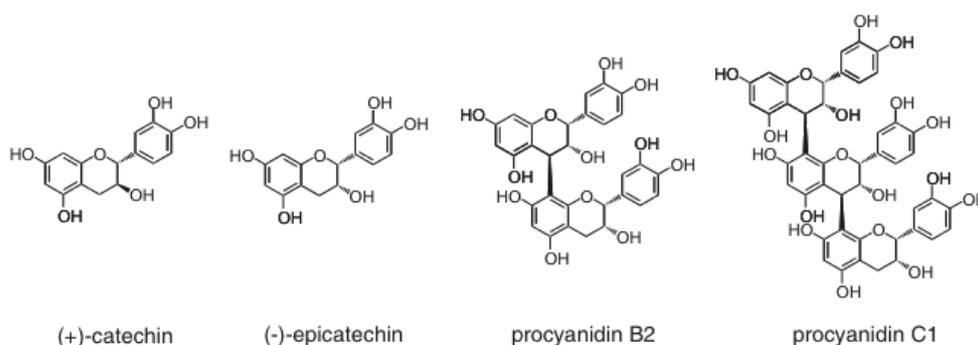


Figura 5: estructuras de los flavan-3-oles más predominantes en el vitaflavan®. (Goodrich, et al., 2012).

El Eminol® es un extracto de hollejo de uva tinta, patentado por el Grupo Matarromera. Procede de la *Vitis vinifera*, variedad tempranillo (D.O. Ribera del Duero). Contiene diferentes tipos de polifenoles, como flavonoides, antocianos, procianidinas, estilbenos.

El Provinols® es un extracto de vino tinto cuya composición incluye ácidos benzóicos, fenoles, ácido cinámicos, estilbenos, flavan-3-oles, flavonoles y antocianos.

Tabla 2: Composición química del extracto de vino tinto Provinols®

Ácidos benzoicos	Ácido gálico, ácido protocatéquico, ácido vanillico etc.
Fenoles	Tirosol, etc.
Ácidos cinámicos	Ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido felurico, etc.
Estilbenos	Resveratrol
Flavan-3-oles	(+)-Catequina, (-)-epicatequina, procianidinas, etc.
Flavonoles	Quercentina, etc.
Antocianos	Delfinidin-3-O-glucosido, Cianidin-3-O-glucosido, etc.

4.1.3 Células

Las células empleadas en los ensayos “*in vitro*” son células adherentes epiteliales de colon (HT29™). Se trata de una línea celular procedente de un adenocarcinoma colorrectal y suministrada por la American Type Culture Collection en estado liofilizado.

- Medios y condiciones de cultivo

Las células HT29 se almacenan en nitrógeno líquido (liofilizadas) hasta su uso. Para su cultivo y expansión se empleó medio Mc Coy’s (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementado con 100U/ml de penicilina, 100 mM de estreptomycin (Sigma-Aldrich) y 10% (V/V) de suero fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich). Tal y como indica la American Type Culture Collection . La expansión celular llevó a cabo en frascos de cultivo de 75 cm² (Corning Flask) y se incubaron a una temperatura de 37°C y atmósfera enriquecida con 5% CO₂ , en incubador de CO₂ Binder (Tuttlingen, Alemania).

Durante los ensayos “*in vitro*” se empleó medio Mc Coy’s enriquecido con SFB (suero fetal bovino) cuando las células HT29™ eran incubadas, ya que estas células así lo requieren. Cuando las células no iban a ser incubadas sino testadas en el espectrofotómetro se empleó medio Mc Coy’s sin suero, ya que en este caso el suero SFB no es necesario.

4.1.4 Lector de microplacas FLUOstarOPTIMA

El lector de microplacas FLUOstarOPTIMA (BMG, Labtech, Offenburg, Germany) es un espectrofotómetro empleado en los ensayos para medir la fluorescencia y absorbancia emitidas por las células.

4.1.5 Microplacas

Los ensayos “*in vitro*” se realizaron sobre microplacas transparentes de 48 pocillos, comercializadas por la casa Sarstedt. El volumen de estos pocillos es de 500µl.

4.1.6 Solución salina PBS

El PBS (phosphate buffered saline) es una solución tampón salina e isotónica muy semejante al líquido extracelular de los mamíferos. Esta solución se utiliza para diluir los compuestos fenólicos y los extractos, así como para lavar las células durante los ensayos “*in vitro*”.

4.1.7 DMSO

El DMSO es un disolvente orgánico que ayuda a la solubilización de los compuestos fenólicos y los extractos favoreciendo su filtrado.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparación de soluciones de compuestos y extractos

Los compuestos polifenólicos puros se preparan a partir de una solución stock de 5mg/ml, en PBS y DMSO al 10% (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA). El DMSO sólo se añadirá a aquellos compuestos que presenten dificultades para disolverse. La solución stock se esteriliza mediante filtrado (Sigma, 0.22 μm PVDF 17 mm pK100). Se preparan distintas diluciones stock en medio PBS para obtener distintas concentraciones. Estas concentraciones son de 100, 250 y 500 $\mu\text{g/ml}$, en el caso de los compuestos puros y 400, 1000 y 2000 $\mu\text{g/ml}$ en el caso de los extractos. Los extractos polifenólicos se preparan a partir de una solución stock de 10 mg/ml, de DMSO en PBS, al 10% (sigma-Aldrich, St Louis, USA). Las diluciones se preparan en campana de flujo laminar Telstar Bio II (Bristol, USA).

A continuación, se prepararon otras diluciones de los compuestos y extractos en medio Mc Coy's con suero al 10%, a partir de las diluciones stock preparadas anteriormente. En el caso de los compuestos puros las concentraciones finales fueron de 50, 100 y 250 $\mu\text{g/ml}$ y en el caso de los extractos 200, 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$. Estas son las soluciones que se emplearon para realizar los ensayos detallados en el siguiente apartado.

4.2.2 Ensayos

Se realizó un ensayo de especies reactivas de oxígeno y un ensayo de citotoxicidad de forma paralela, con el objetivo de identificar aquellos compuestos que presenten actividad antioxidante sin ser citotóxicos para las células empleadas.

Ensayo ROS

El ensayo ROS es un ensayo homogéneo, rápido y luminiscente que mide el nivel de especies reactivas de oxígeno producido por las células. Permite testar las condiciones o los compuestos (inductores o inhibidores) que alteren los niveles de especies ROS. La señal luminiscente obtenida a partir de la medición con un espectofotómetro será directamente proporcional a la concentración de especies ROS producidas por las células en presencia de los compuestos a testar. En el

ensayo, se emplearon H_2O_2 como agente prooxidante y DCFH (diacetato de diclorodihidrofluoresceína) como reactivo fluorescente, necesario para realizar la medición en el espectrofotómetro.

Con este ensayo se evaluó la capacidad antioxidante de distintas concentraciones de los extractos y polifenoles puros. En el caso de los extractos las concentraciones fueron $200\mu M$, $500\mu M$ y $1000\mu M$, y para los polifenoles puros $50\mu M$, $100\mu M$ y $250\mu M$. El objetivo del ensayo fue confirmar qué polifenoles presentan capacidad antioxidante para las células epiteliales de colon HT29TM y a qué concentración es ésta actividad mayor.

Para llevar el ensayo a cabo se sembró una microplaca de 48 pocillos Sarstedt y se dejó incubando durante 24 horas, a $37^\circ C$ y con una atmósfera enriquecida con 5% de CO_2 . A continuación se retiró el medio (Mc Coy's con suero) con el aspirador VACUSAFE de INTEGRA, y se adicionaron las sustancias a testar, preparadas previamente a partir de un stock con medio de cultivo y suero. Las sustancias se distribuyeron de tal forma que cada pocillo tuviera 4 copias de igual concentración. Posteriormente 2 de esas copias contendrán agua oxigenada y las otras 2 no. De los 48 pocillos que tiene la placa, 12 de ellos constituyeron los controles del ensayo, sin las sustancias a testar. A la mitad de ellos se adicionó H_2O_2 . En algunos casos, para disolver algunas de las sustancias se hizo necesario el empleo de DMSO puro y así, facilitar su filtrado, por lo que se añadió DMSO a algunos de los controles, tanto a los que contenían H_2O_2 como a los que no.

Refiérase al anexo 3 para encontrar un ejemplo de la disposición de placa en ensayo ROS.

Tras incubar las sustancias con las células durante 24 horas se añadió directamente al medio $10\mu l$ / pocillo de reactivo fluorescente DCFH (diacetato de diclorodihidrofluoresceína). Las células con el DCFH se incubaron 30 minutos y a continuación se retiró el medio con el reactivo fluorescente y se lavaron las células con PBS añadiendo $500\mu l$ / pocillo. Durante la incubación, se preparó un solución $4mM$ de H_2O_2 en medio sin suero. A continuación, se retiró el PBS y se añadió, únicamente a la mitad de la placa, el agente prooxidante, H_2O_2 ($500\mu l$ / pocillo), de esta forma se pueden observar las diferencias entre la presencia y la ausencia del agente. A la otra mitad de la placa se adicionó una disolución 1:1 de PBS y medio sin suero (no es necesario utilizar en estos pasos anteriores medio Mc coy's enriquecido con suero).

Tras añadir el compuesto prooxidante se cultivan las células durante 1 hora y media y durante 3 horas. En esos tiempos se realizaron las mediciones en un lector de microplacas FLUOstarOPTIMA (BMG, Labtech, Offenburg, Germany) con 485 nm de excitación y 520 nm de emisión. La densidad óptica de las especies ROS producidas en los pocillos de control (sin sustancias) se estableció como la máxima concentración.

Ensayo de citotoxicidad

Se ha realizado un ensayo de citotoxicidad para cuantificar los posibles efectos tóxicos de los extractos de vino, así como de compuestos fenólicos puros sobre células epiteliales de colon HT29™. Para ello se empleó un ensayo colorimétrico basado en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por enzimas mitocondriales succinato-deshidrogenasas (Mosmann, 1983). Estas enzimas rompen el anillo de tetrazolio del MTT, soluble y amarillo, dando lugar a la formación de cristales de formazán, insolubles y de color azul. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

En este ensayo se evaluó la citotoxicidad de distintas concentraciones de los extractos y de los polifenoles puros. En el caso de los extractos las concentraciones fueron 200µM; 500µM y 1000µM; para los polifenoles puros 50µM; 100µM y 250µM. El objetivo del ensayo fue confirmar que los compuestos testados no son tóxicos para las células epiteliales de colon HT29™.

Para llevar a cabo el ensayo, se sembró una microplaca de 48 pocillos Sarstedt y se dejó incubando durante 24 horas, a 37°C y con una atmósfera enriquecida con 5% de CO₂. A continuación se retiró el medio de cultivo (Mc Coy's con suero) con el aspirador VACUSAFE de INTEGRA y se adicionaron las sustancias a testar diluidas anteriormente, a partir de un stock en medio y suero. Las sustancias se distribuyeron de tal forma que cada pocillo tuviera 4 copias de igual concentración. De los 48 pocillos que tiene la placa 12 de ellos constituyeron los controles del ensayo, sin las sustancias a testar. En algunos casos, para disolver algunas de las sustancias se hizo necesario el empleo de DMSO puro y así facilitar su filtrado, por lo que se añadió DMSO a algunos de los controles. El resto de los controles contenían células con una disolución 1:1 de medio y PBS.

La disposición de la placa para este ensayo se ordenó de igual forma que para el ensayo ROS, la única diferencia es que no se tiene en cuenta la división de la placa para el H₂O₂. Por lo tanto, la figura presente en el anexo 3 representa, también, un ejemplo de disposición para el ensayo de citotoxicidad.

Tras incubar las sustancias durante 24 horas con las células, se retiró el medio de cultivo y se añadió el reactivo MTT (Sigma-Aldrich, St.Louis USA). El reactivo se disolvió en PBS en el momento de su uso, a una concentración de 0,5 mg/ml y se añadieron 500 µl a cada pocillo.

Después de incubar durante 3 horas, se disolvieron los cristales formados con una solución DMSO/etanol (1:1, v/v). Finalmente se midió la absorbancia de la placa en un lector de microplacas BMG FLUOstar Optima a una longitud de onda de 570nm. Como control, se utilizaron las células sin adición de sustancias. La densidad óptica del formazán producido en los pocillos control (sin sustancias) se estableció como la máxima viabilidad (100%).

4.3 Cultivos celulares

Cuando las células alcanzaron la confluencia en los frascos de cultivo (Corning Flask), se trataron con tripsina y se sembraron en una placa de 48 pocillos a una densidad de 8×10^4 células/pocillo para realizar los ensayos de citotoxicidad (MTT) y de especies reactivas de oxígeno (ROS). El conteo celular se realizó mediante el método de exclusión con azul de triptano, empleando para ello, la cámara de Neubauer. Se preparó una mezcla 1:1 de la solución con las células y el colorante al 0,4% que se cargó en la cámara de Neubauer y se analizó mediante el empleo del microscopio de contraste de fases invertido. Este colorante permite diferenciar células vivas de células muertas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al testar la capacidad antioxidante de un compuesto es necesario conocer su posible citotoxicidad. Por ello, se realizó un ensayo de citotoxicidad (MTT) paralelo al ensayo de especies reactivas de oxígeno (ROS), en células HT29TM. Se utilizaron concentraciones crecientes de los compuestos polifenólicos puros (50, 100 y 250 $\mu\text{g/ml}$) en ambos ensayos.

Como control se consideraron a aquellos pocillos que sólo contenían células en el medio de cultivo (sin sustancias), este se utilizó de referencia para representar el “control + H_2O_2 ” y el “control + H_2O_2 + DMSO”. Se han representado los resultados obtenidos en presencia de H_2O_2 , por lo que deben ser comparados con los controles que contienen H_2O_2 . De igual forma ocurre con el DMSO, aquellos resultados que se han obtenido en presencia de DMSO solo pueden ser comparados con controles que contengan DMSO. El porcentaje que representan ambos controles, en las gráficas de resultados, ha sido calculado en función del promedio de los controles sin sustancias.

La densidad óptica emitida por pocillos control se estableció como el 100% de producción de especies ROS (en el caso del ensayo ROS) y como 100% de viabilidad celular (en el caso del ensayo de citotoxicidad MTT). Se considera que un compuesto inhibe las especies reactivas de oxígeno cuando la concentración de éstas decrece un 20% o más. De igual forma, se considera citotóxico a aquel compuesto que disminuye la viabilidad celular en un 20% o más.

A continuación se muestran los resultados ROS obtenidos a 1,5 horas y los resultados MTT obtenidos a las 3 horas. No se han incluido los resultados ROS a las 3 horas ya que no se observaron diferencias significativas entre los dos tiempos.

La Figura 6 muestra los resultados obtenidos en ambos ensayos para los compuestos (+)-catequina, (-)-epicatequina y ácido gálico. En este caso, no se empleó DMSO con ningún compuesto. La gráfica del ensayo ROS muestra que ninguna concentración de ninguno de estos compuestos presenta actividad antioxidante ya que la producción de las especies ROS no llega a disminuir en un 20%. En la gráfica del ensayo MTT se puede observar como la (+)-catequina y la (-)-epicate-

quina no son tóxicas a ninguna concentración. Por el contrario, el ácido gálico a concentración 250µM presenta cierta toxicidad, ya que la viabilidad celular decrece hasta un 80% respecto al control.

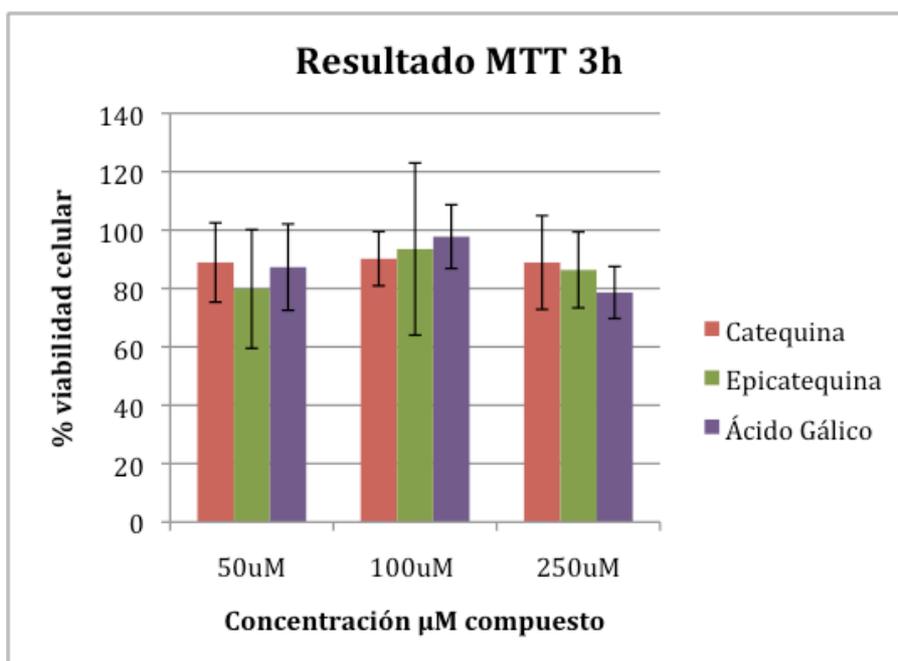
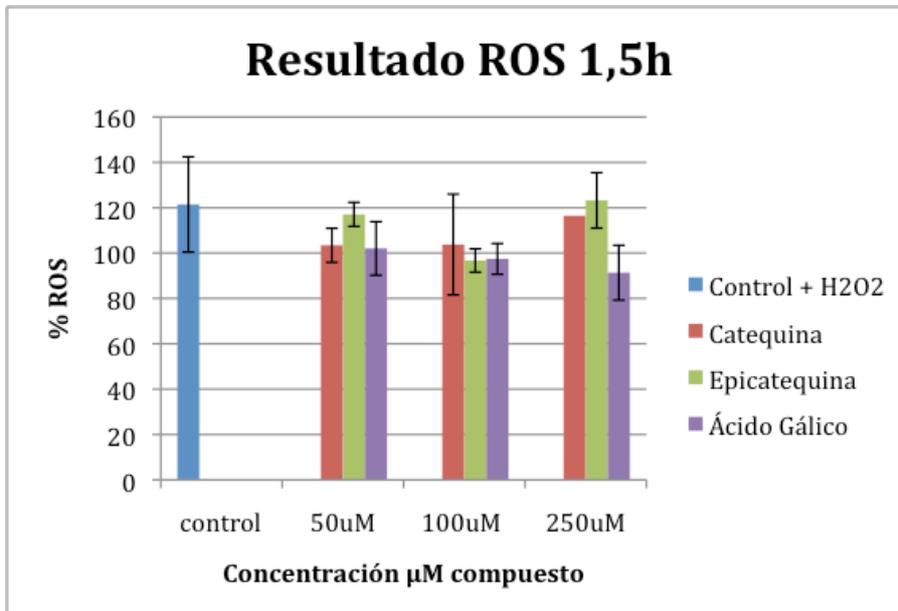


Figura 6: Resultados obtenidos en los ensayos ROS y MTT de los compuestos catequina, epicatequina y ácido gálico.

En la Figura 7 se representan los resultados obtenidos en ambos ensayos para los compuestos quercetina, ácido cafeico y aldehído protocatéquico. La quercetina requirió ser disuelta con DMSO, los resultados de este compuesto serán comparados con el control + DMSO. Dichos resultados indican que a las concentraciones 100µM y 250µM la quercetina y el aldehído protocatéquico disminuyen la síntesis de especies reactivas de oxígeno. En el caso de la quercetina esa

disminución es del 30% respecto del control + DMSO a concentración 100µM y del 20% a concentración 250µM. Para el aldehído protocatéutico, la disminución es del 35% respecto del control + H₂O₂, a concentración 100µM y del 25% a concentración 250µM. Los resultados del ensayo de citotoxicidad demuestran que cada uno de estos compuestos no disminuyen la viabilidad celular a ninguna concentración testada.

En la gráfica del ensayo MTT los valores de % viabilidad celular para la quercetina quedan por encima del 100%. Se hipotetiza que esto puede ser debido a que este compuesto no sólo no reduce la viabilidad celular, sino que la aumenta.

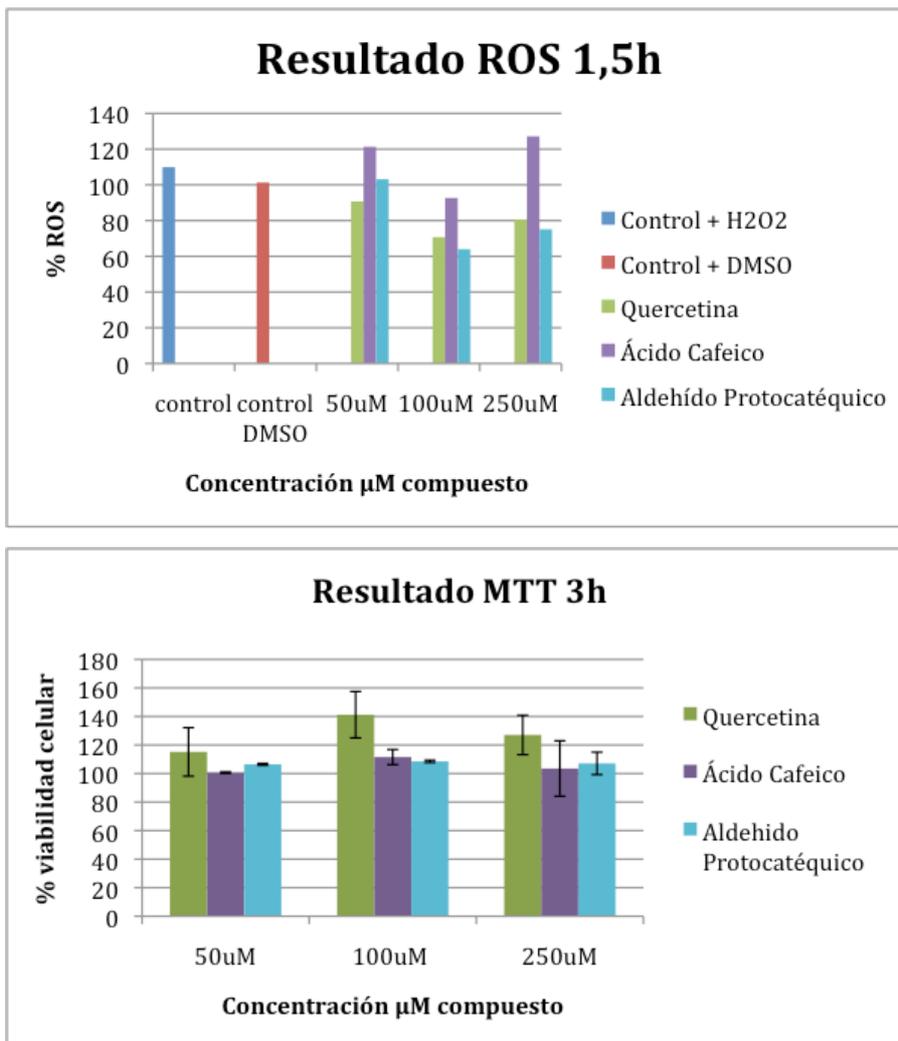


Figura 7: Resultados obtenidos para los ensayos ROS y MTT de los compuestos quercetina, ácido caféico y aldehído protocatéutico.

En la Figura 8 se muestran los resultados obtenidos en ambos ensayos para los compuestos ácido protocatéutico, ácido telúrico y aldehído coniferílico. La gráfica del ensayo ROS revela que el aldehído coniferílico inhibe la producción de especies reactivas de oxígeno en un 20% respecto del control con H₂O₂, a todas las concentraciones testadas. No obstante, en el gráfico del ensayo de citotoxicidad, se observa que a concentración 250µM el aldehído coniferílico es tóxico para las

células empleadas. Tanto el aldehído coniferílico como el ácido ferúlico reducen la viabilidad celular un 20% aproximadamente, a concentración 250µM.

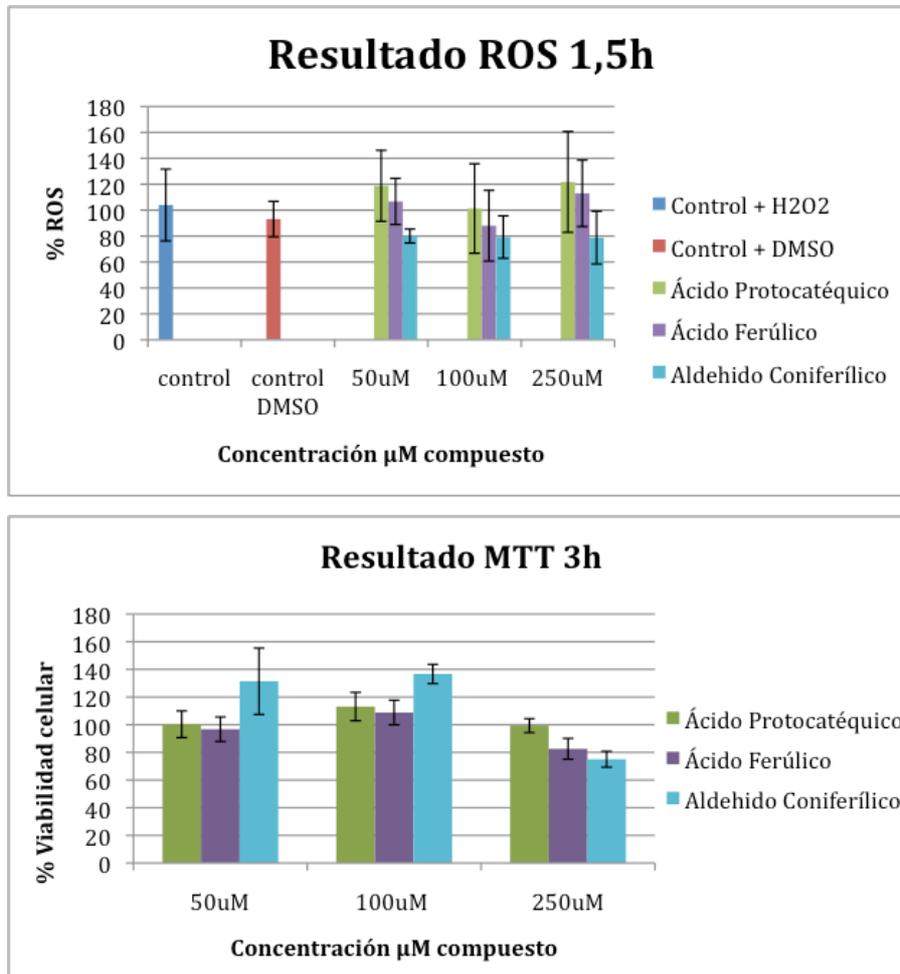


Figura 8: Resultados obtenidos para los ensayos ROS y MTT de los compuestos ácido protocatéquico, ácido ferúlico y aldehído coniferílico.

En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos en ambos ensayos para los compuestos ácido clorogénico y ácido P-cumárico. La gráfica del ensayo ROS demuestra que ninguno de estos dos compuestos inhibe la síntesis de especies reactivas de oxígeno. De la misma forma, la gráfica del ensayo MTT no muestra reducciones significativas de la viabilidad celular, por lo que no existe actividad citotóxica por parte de estos compuestos.

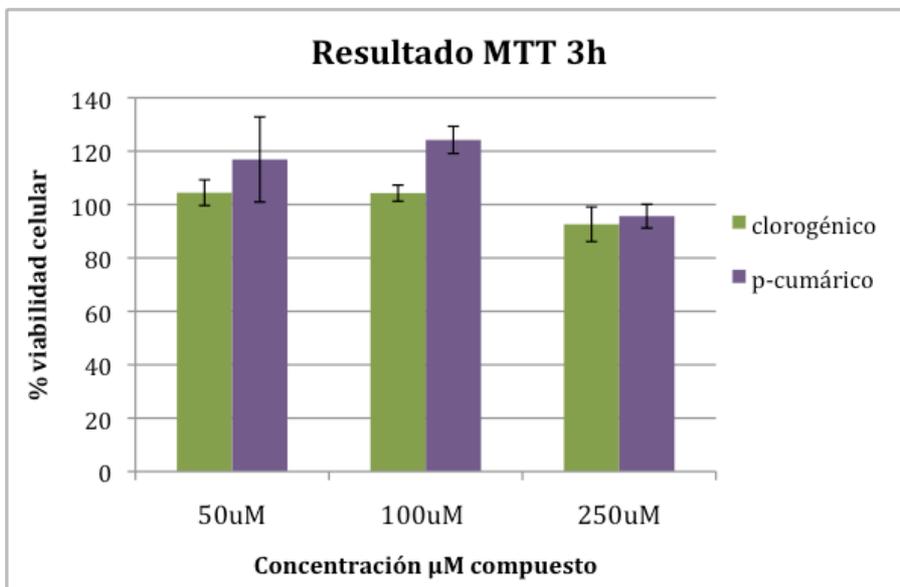
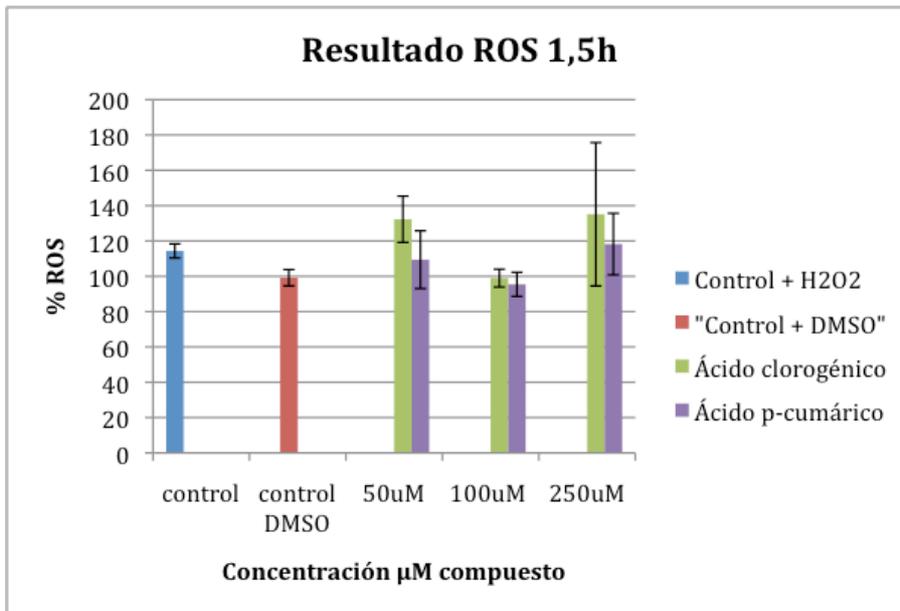


Figura 9: Resultados obtenidos para los ensayos ROS y MTT de los compuestos ácido clorogénico y ácido p-cumárico.

También se ensayó la capacidad antioxidante de tres extractos de vino: vitaflavan®, provinols® y eminol®, a concentraciones crecientes de 200, 500 y 1000 μM . Para ello se siguió la misma metodología que en el caso de los compuestos fenólicos puros descritos anteriormente: se realizó en ensayo de especies reactivas de oxígeno y de forma paralela, un ensayo de citotoxicidad en las células HT29TM.

Los controles se prepararon de igual forma y se estableció como el 100% de la producción de especies ROS y como el 100% de la viabilidad celular el control sin sustancias. Para disolver los 3 extractos fue necesario el empleo de DMSO, por lo que los resultados obtenidos se comparan con el control + DMSO. Se considera que un extracto inhibe la formación de especies reactivas de

oxígeno cuando la concentración de éstas decrece en un 20% o más. Se considera que un extracto es citotóxico cuando reduce la viabilidad celular en un 20% o más.

En la Figura 10 se muestran los resultados obtenidos en ambos ensayos para los extractos vitaflavan®, provinols® y eminol®. La gráfica revela que tanto el vitaflavan®, como el provinols® inhiben la producción de especies reactivas de oxígeno a concentraciones iguales o superiores de 500µM. En el caso del vitaflavan® dicha producción se reduce en un 35% a una concentración 1000µM. En el caso del provinols®, la producción se reduce un 20% aproximadamente a concentraciones de 500µM y 1000µM. No obstante, los resultados obtenidos del ensayo MTT muestran que el vitaflavan® reduce la viabilidad celular en un 40% a concentración 1000µM. De igual forma, el provinols® reduce en un 45% la viabilidad celular a la misma concentración.

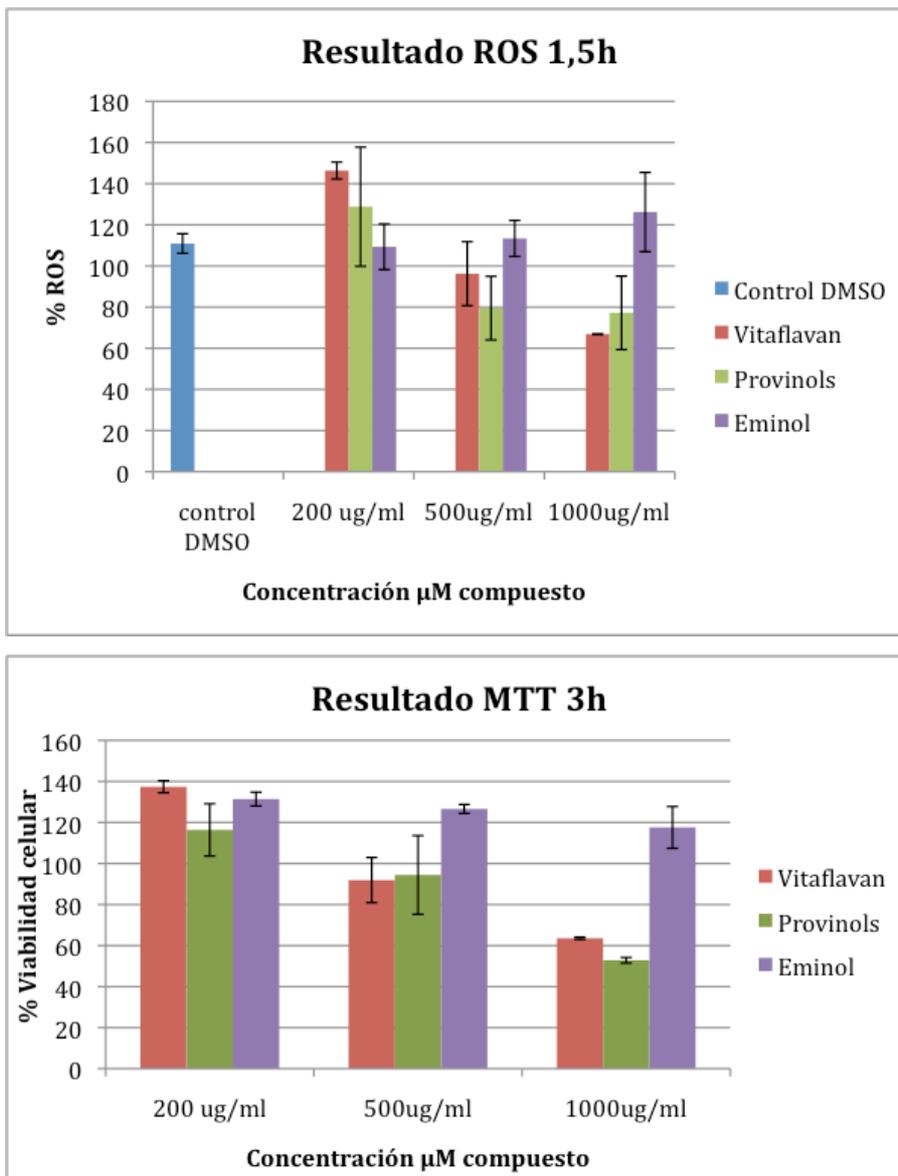


Figura 10: Resultados obtenidos para los ensayos ROS y MTT de los extractos.

6. REFLEXIÓN DIDÁCTICA

Realizar este trabajo me ha permitido descubrir el mundo de la enología aplicada y lo mucho que puede ofrecernos. Más allá del placer que proporciona el consumo de una bebida tan característica y elaborada como el vino, encuentro fascinante la cantidad de beneficios que puede tener para nuestra salud. Me ha resultado muy interesante poder realizar este trabajo con el apoyo de unas prácticas realizadas en el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, institución que ha representado para mí una ventana al mundo laboral y su funcionamiento, pero también, donde he tenido la oportunidad de adquirir conocimientos específicos acerca del vino y sus componentes, conocimientos que sin ninguna duda han constituido la base para la realización de este trabajo. Por último, he podido comprobar que todos los conocimientos adquiridos en la carrera de biotecnología no pueden utilizarse de forma individual, sino que se complementan entre sí. La realización de este proyecto ha requerido conocimientos de biología, microbiología, genética, genética molecular, informática, técnicas instrumentales, pero sobretodo de inmunología, química orgánica y cultivos celulares.

7. CONCLUSIONES

- Los polifenoles son buenos antioxidantes gracias a la capacidad que poseen de reducir el estrés oxidativo, y de esta forma, aumentar la viabilidad celular.
- Algunos polifenoles como la quercetina, los aldehídos protocatéquico y conferílico, así como, los extractos de uva vitaflavan® y provinols®, reducen significativamente (más de un 20%) la síntesis de especies reactivas de oxígeno.
- La quercetina y el aldehído protocatéquico reducen en más de un 20% las especies reactivas de oxígeno a concentraciones iguales o mayores de 100µg. El Aldehído conferílico tiene el mismo efecto a todas las concentraciones testadas (50, 100 y 250µM). De los extractos ensayados, el provinols® y el vitaflavan® reducen la concentración de especies reactivas de oxígeno a concentraciones iguales o mayores de 1000µM, el primero, y a concentraciones iguales o mayores de 500µM el segundo.
- Algunos polifenoles como los ácidos gálico y telúrico, así como, el aldehído conferílico resultan tóxicos a altas concentraciones (iguales o mayores de 250µM). También son tóxicos a altas concentraciones (1000µM) los extractos de uva provinols® y vitaflavan®.

Conclusiones derivadas de la revisión bibliográfica

- Las dosis de polifenoles que normalmente se presentan en la dieta han demostrado no tener efectos negativos sobre la salud. Sin embargo, se ha de tener en cuenta que estas proyecciones se realizan considerando un consumo moderado y regular.

- Los compuestos fenólicos, en especial la catequina, quercetina y resveratrol son potentes antioxidantes con efectos terapéuticos demostrados y ampliamente estudiados. Sin embargo, existen multitud de polifenoles cuyas aplicaciones terapéuticas están por descubrir. La amplitud de posibles aplicaciones y el impacto potencial en la salud humana avalarían un mayor estudio de los compuestos fenólicos.
- Existen múltiples estudios acerca de los efectos que tienen los polifenoles sobre la salud humana de forma individual. Sería interesante testar los polifenoles en conjunto para evaluar sus efectos sobre el organismo cuando se encuentran asociados.
- Un mayor y mejor estudio de los efectos de los polifenoles sobre la salud permitiría refinar conceptos como el de “calidad de un polifenol”. Distinguiendo por ejemplo, entre polifenoles con mayor potencial terapéutico y menor toxicidad y aquellos polifenoles con altos índices de toxicidad en bajas concentraciones o menor potencial terapéutico.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Albani, D., Polito, L., Signorini, A., & Forloni, G. (2010). Neuroprotective Properties of Resveratrol in Different Neurodegenerative Disorders . *Biofactors* , 36, 370-376.
2. Angel-Morales, G., Noratto, G., & Mertens-Talcott, S. (2012). Red Wine Polyphenolics Reduces The Expression of Inflammation Markers in Human Colon-Derived CCD-18 Co Myofibroblast Cells: Potential Role of MicroRNA-126. *Food and Function* , 3, 745-751.
3. Araújo, J. R., Gonçalves, P., & Martel, F. (2011). Chemopreventive Effect of Dietary Poliphenols in Colorectal Cancer Cells Lines. *Nutrition Research* , 31, 77 - 87.
4. Balu, M., Sangeetha, P., Haripriya, D., & Panneelselvam, C. (2005). Rejuvenation of Antioxidant System in Central Nervous System of aged Rats by Grape Seed Extract . *Neurosci. Lett.* , 383, 295 - 300.
5. Balu, M., Sangeetha, P., Murali, G., & Panneerselvam, C. (2006). Modulatory Role of Grape Seed Extract on Aged-related Oxidative DNA Damage in Central Nervous System of Rats. *Brain Res. Bull.* , 68, 469 - 473.
6. Baur, J. A., & Sinclair, D. A. (2006). Therapeutic Potential of Resveratrol: The In Vivo Evidence. *Nature Reviews Drug Discovery* , 5, 493-506.
7. Bishayee, A. (2009). Cancer Prevention and Treatment with Resveratrol: From Rodent Studies to Clinical Trials. *Cancer Prevention Research* , 2 (5), 409-418.
8. Bruneton, J. (1993). *Farmacognosia: Fitoquímica y Plantas Medicinales* (2ª Edición ed.). (A. Villar del Fresno, E. Carretero Accame, & M. Rebuella Lizabe, Trads.) Madrid, Madrid, España: Editorial ACRIBIA S.A.

9. Cheynier, V., Duenas, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J., Sarni-Manchado, P., y otros. (2006). Structure and Properties of Wine Pigments and Tannins. *American Journal of Enology and Viticulture* , 57, 298-305.
10. Cheynier, V., Scheider, R., Salmon, J., & Fulcrand, H. (2010). Chemistry of Wine. *Comprehensive Natural Products II* , 3, 1119 - 1172.
11. Cueva, C. (12 de 2011). Vino y Salud: Mejora de la Calidad Sanitaria del Vino por Hongos de la Vid y Modulación de la Microbiota Humana por Polifenoles del Vino. Madrid.
12. Esteban Fernandez, A. (2013). Estudio de la Inhibición, por Compuestos Fenólicos, de la Adherencia de una Cepa de Escherichia Coli Uropatógena a Células Humanas de Epitelio de Vejiga. (U. A. ALimentación, Ed.) Madrid, España.
13. Fulcrand, H., Duenas, M., Salas, E., & Cheynier, V. (2006). Phenolic Reactions During Winemaking and Aging. *American Journal of Enology And Viticulture* , 57, 289-297.
14. García-Nebot, M. J., Recio, I., & Hernandez-Ledesma, H. (2014). Antioxidant Activity and Protective Effects of Peptide Linasin Against Oxidative Stress in Intestinal Caco-2-cells. *Food and Chemical Toxicology* , 65, 155-161.
15. Garrido, J., & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols - A chemical perspective. *Food Research International* , 54, 1844-1858.
16. Goodrich, K. M., Fundaro, G., Giffin, L. E., Grant, A., Hulver, M. W., Ponder, M. A., y otros. (2012). Chronic administration of dietary grape seed Extract increases colonic expression of gut tight junction protein occludin and reduces fecal calprotectin: a secondary analysis of healthy Wistar Furth rats. *Nutrition Research* , 32, 787-794.
17. Heier, A., Blaas, W., Dross, A., & Wittkowski, R. (2002). Athocyanin Analysis by HPLC/ESI-MS. *American Journal of Enology and Viticulture* , 53, 78-86.
18. Houstis, N., Rosen, E. D., & Lander, E. S. (2006). Reactive Oxygen Species Have a Causal Role in Multiple Forms of Insuline Resistance. *Nature* , 440, 944-948.
19. Jeng-Feng, L., Semon, W., Shiang-Sou, H., Bo-Yi, L., Su-Man, L., Shen-Kou, T., y otros. (2011). Resveratrol Protec Left Ventricle by Increasing Adenylate Kinase 1 and Isocitrate Dehydrogenase Activities in Rats with Myocardial Infarction. *Chinese Journal of Physiology* , 54 (6), 406-412.(s.f.).
20. Kao, C. L., Chen, L. K., Chang, Y. L., Yung, M. C., Hsu, C. C., Chen, Y. C., y otros. (2010). Resveratrol Protects Human Endothelium from H(2)O(2)-induced Oxidative Stress and Senescence via SIRT1 Activation. *Atheroscler Thromb* , 17, 970 - 979.
21. Korkina, L. G., & Afanas'ev, I. B. (1997). Antioxidant And chelating Properties of Flavonoids. *Adv. Pharmacol* , 38, 151-166.
22. Kuntz, S., Wenzel, U., & Daniel, H. (1999). Comparative Analysis of the Effects of Flavonoids on Proliferation, Cytotoxicity, And Apoptosis in Human Colon Cancer Cell Lines. *European Journal of Nutrition* , 38, 133-142.

23. Leifert, W. R., & Abeywardena, M. Y. (2008). Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutrition Research* , 28, 729-737.
24. Linskens, H. F., & Jackson, J. F. (1988). Phenolic Composition of Natural Wine Types - Wine Analysis. *SpringerVerlag Press* .
25. Lunte, S. M., Blankenship, K. D., & Read, S. A. (1988). Detection and Identification of Procyanidins and Flavanols in Wine by Dual-Electrode Liquid Chromatography-Electrochemistry. *Analyst* (113), 99-102.
26. Milne, J. C., Lambert, P. D., Schenk, S., Carney, D. P., Smith, J. J., Gagne, D. J., y otros. (2007). Small Molecules Activators of SIRT1 as Therapeutics for The Treatment of Tipe 2 Diabetes. *Nature* , 450, 712-716.
27. Mikstacka, R., Rimando, A. M., & Ignatowicz, E. (2010). Antioxidant Effect of Trans-resveratrol, pterostilbene, quercetin and their combination in human erythrocytes in vitro. *Plant Foods for Human Nutrition* , 65, 57 - 63.
28. Neveu, V., Perez-Jimenez, J., Vos, F., Crespy, V., Du Chaffaut, L., Mennen, L., y otros. (2010). *Phenol-Explorer: An Online Database on Polyphenol Contents in Foods. Database*, DOI: 10. Recuperado el 10 de 05 de 2014, de Phenol-Explorer: <http://www.phenol-explorer.eu/reports/38>
29. Nadochiy, S. M., & Redman, E. K. (2011). Mediterranean Diet and Cardioprotection: The Role Of Nitrile, Polyunsaturated Fatty Acids and Polyphenols. *Nutrition* , 27, 733-744.
30. Nunes, C., Ferreira, E., Freitas, V., Almeida, L., Barbosa, R. M., Laranjihna, J., y otros. (2013). Intestinal Anti-inflammatory Activity of Red Wine Extract: Unveiling the Mechanisms in Colonic Epithelial Cells. *Food & Function* , 4, 373 - 383.
31. Papadopoulou, C., Soulti, K., & Roussis, I. G. (2005). Potential Antimicrobial Activity or Red and White Wine Phenolic Extracts Against Strains of Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Candida albicans. *Food Technology and Biotechnology* , 43, 41-46.
32. Quiñones, M., Miguel, M., & Alexandre, A. (2012). Los Polifenoles, Compuestos de Origen Natural con Efectos Saludables Sobre el Sistema Cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria* , 27 (1), 76.89.
33. Ramos, S. (2008). Cancer Chemoprevention and Chemotherapy: Dietary Polyphenols and Signaling Pathways. *Molecular Nutrition Food Research* , 52, 507-526.
34. Ramos, S. (2007). Effects of Dietary Flavonoids on Apoptotic Pathways Related to Cancer Chemoprevention. *The Journal of Nutritional Biochemistry* , 18, 427-42.
35. Rodrigo, R., Miranda, A., & Vergara, L. (2011). Modulation of Endogenous Antioxidant System by Wine Polyphenols in Human Disease. *Clinica Chimica Acta* , 412, 410-424.
36. Vanzo, A., Cecotti, R., Vrhovsek, U., Torres, A. M., Mattivi, F., & Passamonti, S. (2007). Defate of Trans-caftaric Acid Administered into the Rat Stomacht. *Journal of Agricultural of Food and Chemistry* , 50 (4), 1604-1611.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo en relación con las practicas realizadas allí.

A María Victoria y a Dolores por ser mis co-tutoras en este trabajo y ayudarme en todo lo que les ha sido posible.

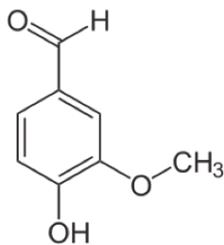
Quiero dirigir un especial agradecimiento a Adelaida por todo lo que me ha enseñado estos últimos 4 meses, por ser mi compañera y guía en el CIAL y por haber encontrado siempre en ella una mano amiga a la que acudir. También le agradezco haberme cedido los resultados que reflejo en este trabajo y haberme enseñado como gestionarlos.

ANEXOS

ANEXO 1: CLASIFICACIÓN SEGÚN SU ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS POLIFENOLES MÁS FRECUENTES EN EL VINO

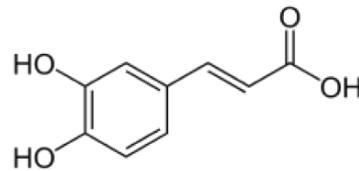
Ácidos fenólicos:

Derivados del ácido benzoico



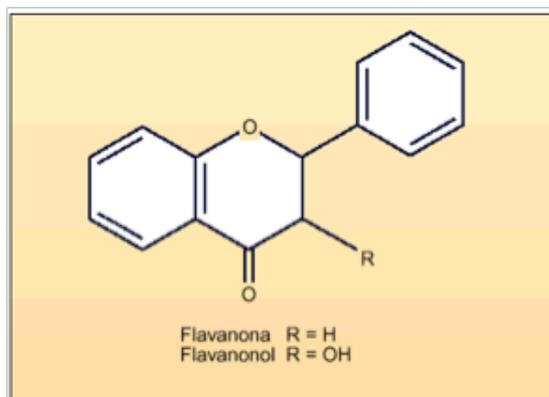
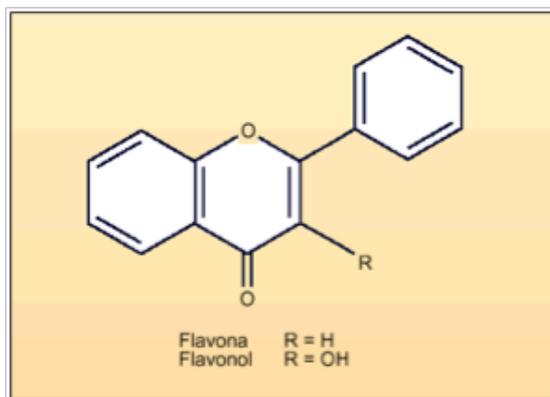
Vanillina

Derivados del ácido cinámico

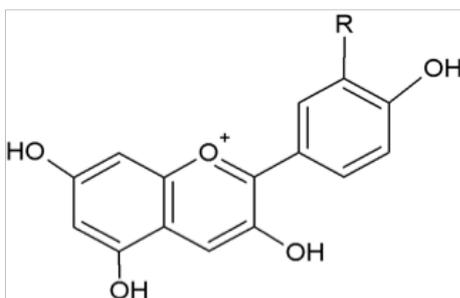


Ácido cafeico

Flavonoides:

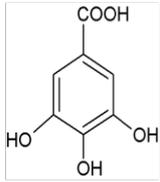


Antocianidina

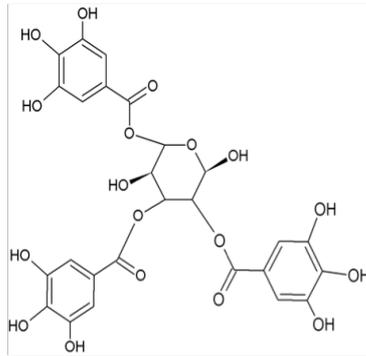


Taninos:

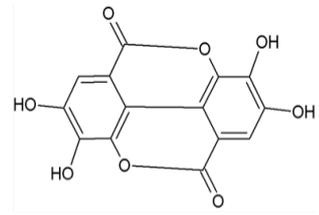
Hidrolizables



Ácido gálico

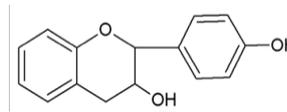
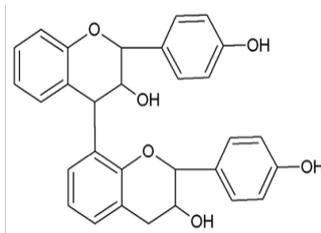


Galotanino



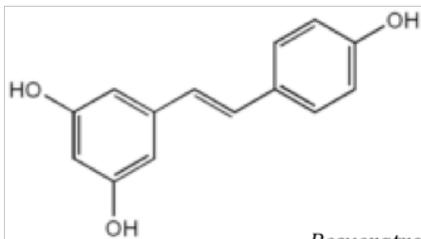
ácido hexahidroxidifénico

Condensados



3-flavanol

Estilbenos:



Resveratrol

ANEXO 2: PRINCIPALES COMPUESTOS FENÓLICOS IDENTIFICADOS EN VINOS JÓVENES

	Concentración (mg/L)		Concentración
<u>Ácidos hidroxibenzoicos</u>		<u>Flavonoles</u>	
Ácido gálico	10-37	Miricetín-3-glicósidos	1,6-22
Ácido protocatéquico	1,2-4,7	Quercetín-3-glicósidos	1,3-34
Ácido siríngico	4,2-5,8	Kanferol-3-glicósidos	trazas
<u>Ácidos hidroxicinámicos</u>		Isoramnetin-3-glicósidos	trazas
Ácido caftárico	0,7-46	Miricetina	1,7-8
Ácido cutárico	0,7-11	Quercetina	1,9-15
Ácido caféico	0,3-33	Kanferol	Trazas
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,1-8	Isoramnetina	Trazas
<u>Estilbenos</u>		<u>Antocianinas</u>	
<i>trans</i> -Resveratrol	0,4-2,5	Delfinidín-3-glucósido	7-11
<i>trans</i> -Resveratrol-3- <i>O</i> -glucósido	0,1-3	Petunidín-3-glucósido	14-25
<u>Alcoholes</u>		Malvidín-3-glucósido	170-260
Tirosol	7-26	Malvidín-3-(6-acetil)-	23-108
Triptofol	nd-4,5	Malvidín-3-(6-cafeil)- glucósido	3,5-5,6
<u>Flavan-3-oles</u>		Malvidín-3-(6- <i>p</i> -cumaril)- glucósido	16-28
(+)-Catequina	16-58		
(-)-Epicatequina	10-38		
Procianidinas B1, B2, B3, B4	14-33		

ANEXO 3: EJEMPLO DE DISPOSICIÓN EN PLACA DE 96 POCILLOS

Ejemplo disposición de placa en ensayo ROS

