

Valorización de lías de vino como ingredientes antihipertensivos

Wine lees valorization as antihypertensive ingredients

Francisca Isabel Bravo^{1,2}, Raúl López-Fernández-Sobrino¹ y Begoña Muguerra^{1,2}

¹Universitat Rovira i Virgili, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Nutrigenomics Research Group, 43007 Tarragona, Spain

²Nutrigenomics Research Group, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili. C/ Marcel·lí Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain

Resumen. Algunos coproductos vitivinícolas se han utilizado para obtener extractos enriquecidos en (poli)fenoles con efectos antihipertensivos. Sin embargo, aún se desconoce si las lías de vino (LV) contienen compuestos antihipertensivos. Este estudio se centró en estudiar si las LV podría ser fuente de estos compuestos. Se evaluó la actividad antihipertensiva de cinco LV (fracción líquida, 5 mL/kg) en ratas hipertensas (SHR). Una de las LV mostró un fuerte efecto antihipertensivo, que se asoció con su alto contenido en flavanoles y antocianinas. La reducción del estrés oxidativo y mejora del estado redox y disfunción endotelial fueron algunos mecanismos involucrados en su bioactividad. Además, las LV se sometieron a extracción asistida por enzimas (Flavourzyme®), lo cual solubilizó compuestos fenólicos (57.20%) inicialmente no solubles. Ácido gálico, catequina y malvidina-3-glucósido fueron los principales (poli)fenoles de este hidrolizado. Además, el hidrolizado mostró una mayor actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina, antioxidante y antihipertensiva que las LV. Los péptidos FKTTDQQTRTTVA, NPKLVTIV, TVTNPARIA, LDSPSEGRAPG y LDSPSEGRAPGAD, identificados en el hidrolizado, exhibieron actividad antihipertensiva en SHR (10 mg/kg). LV son una buena fuente de compuestos antihipertensivos con potencial para usarse como nutracéuticos o ingredientes funcionales. Esto permitiría la valorización de las mismas y contribuiría a la economía circular de la industria vitivinícola.

Abstract. Some winery by-products have been used to obtain phenolic-enriched extracts with antihypertensive effects. However, the presence of antihypertensive compounds in wine lees (WL) remains unexplored. Therefore, the aim of our study was to evaluate whether WL could be a source of antihypertensive compounds. The blood pressure-lowering effect of the liquid fraction of five WL was evaluated in spontaneously hypertensive rats (SHR) after acute administration (5 mL/kg). One of the tested WL exhibited potent antihypertensive effects, which were associated with their high content of flavanols and anthocyanins. Their bioactivity was mediated by a reduction in oxidative stress and an improvement in the redox state and endothelial dysfunction. Furthermore, WL were subjected to enzyme-assisted extraction (Flavourzyme®), which released non-soluble (poly)phenols (57.20%). Gallic acid, catechin, and malvidin-3-glucoside were the major phenolic compounds in this hydrolysate. Moreover, it showed greater angiotensin-converting enzyme inhibitory, antioxidant, and antihypertensive activities than the one shown by WL. Additionally, the peptides FKTTDQQTRTTVA, NPKLVTIV, TVTNPARIA, LDSPSEGRAPG, and LDSPSEGRAPGAD identified in the hydrolysate exhibited antihypertensive activity in SHR (10 mg/kg). Thus, WL is a good source of antihypertensive compounds with the potential to be used as nutraceuticals or functional ingredients. This would allow WL valorization and contribute to circular economy in wineries.

1 Introducción

La hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad crónica con una alta incidencia en nuestra sociedad. Se estima que aproximadamente 1280 millones de personas entre 30 y 79 años la sufren [1] y es la principal causa de muerte mundial, alcanzando los 8,5 millones de muertes anuales en 2015 [2]. Existen diferentes tratamientos para el control de la HTA que son eficaces para la mayoría de los pacientes; sin embargo, algunos de estos fármacos pueden producir efectos secundarios y además no son recomendados para las personas prehipertensas (que están en proceso de desarrollo de HTA con valores de presión arterial (PA) sistólica (PAS) entre 130–139 mmHg y de PA diastólica (PAD) de entre 85–89 mmHg) [3]. Así que existe un gran interés en buscar nuevos compuestos, principalmente de origen natural, que ayuden a prevenir esta enfermedad [4,5] y no produzcan efectos secundarios o al menos sean más leves. Entre estos nuevos compuestos bioactivos destacan los obtenidos a partir de los alimentos, principalmente, los compuestos fenólicos y los péptidos bioactivos [4]. Se ha evidenciado que estos compuestos pueden modular la PA a través de diferentes mecanismos, como inhibiendo a la enzima convertidora de angiotensina (ECA), mejorando la función endotelial o reduciendo las especies reactivas de oxígeno (ROS) [5–7]. La ECA es una enzima clave en la regulación de la PA dentro del sistema renina angiotensina, dado que su acción libera al vasoconstrictor angiotensina II [8]. Además, en los últimos años, se ha puesto de manifiesto que los coproductos de la industria agroalimentaria pueden ser otra fuente interesante de estos compuestos funcionales. Esto ayudaría a valorizar estos coproductos produciendo productos de alto valor añadido, reduciría los costes de su eliminación y ayudarían a que las industrias agroalimentarias sean más respetuosas con el medioambiente [9–11]. Esta valorización es de gran importancia ya que anualmente se generan grandes cantidades de estos coproductos en la industria agralimentaria [9].

Las uvas son uno de los cultivos frutales más importantes del mundo [12]. Aproximadamente, el 57% de su producción se destinada a la elaboración de vino [13] (aproximadamente 157 mhL en 2022) [14]. Sin embargo, el proceso de elaboración del vino genera grandes cantidades de coproductos, que son ricos en compuestos fenólicos de la uva [15]. Además, muchos de estos compuestos pueden inhibir a la ECA y reducir la PA [4,11]. De hecho, algunos de los coproductos vitivinícolas, como el orujo, las pieles o el raspón de la uva, se han utilizado para obtener extractos enriquecidos en compuestos fenólicos capaces de reducir la PA [11]. Sin embargo, el potencial efecto antihipertensivo de otros coproductos vitivinícolas como las lías del vino permanecía sin explorar, previo a nuestro estudio. Este coproducto representa el 25% del total de coproductos vitivinícolas [16]. Así, nuestro estudio se centró en investigar el potencial de las lías de vino como fuente de compuestos antihipertensivos con el fin de poder ser utilizados como ingredientes funcionales, nutracéuticos o complementos alimenticios.

2 Valorización del sobrenadante de lías de vino

Los procesos de centrifugación o filtración permiten la separación de dos fases en las lías del vino, la fase sólida y la líquida. La proporción de ambas fases puede variar según el tipo de lías o el procedimiento utilizado para obtenerlas, dado que se puede añadir agua para retirar las lías de los depósitos. La fase sólida se compone principalmente de levaduras, carbohidratos insolubles, compuestos fenólicos, proteínas, lignina, tartratos y otros materiales como la piel de la uva [17]. En cuanto a la fase soluble o líquida, ésta se compone de ácidos orgánicos, etanol y compuestos fenólicos solubles [17]. Considerando este hecho, inicialmente el estudio se centró en valorizar la fracción soluble de las lías.

2.1 Evaluación del efecto antihipertensivo de las lías de vino

En primer lugar, se evaluó el potencial efecto antihipertensivo de las lías del vino [18]. Es conocido que la composición fenólica de las frutas y verduras varía dependiendo de diferentes factores, incluyendo la variedad, el tipo de fruta o vegetal, o las condiciones de pre- y pos-cosechado [19]. Por lo tanto, las lías del vino podrían tener diferente composición fenólica dependiendo de la variedad de la uva o sus condiciones de crecimiento, madurez, etc. Así, se seleccionaron cinco lías de primera fermentación, obtenidas durante la elaboración de vinos monovarietales (cuatro variedades de uva tinta: Cabernet, Garnacha, Mazuela, Merlot, y una variedad de uva blanca: Macabeo). Estas lías se centrifugaron (3000 × g, 15 min, 4 °C) para obtener la fracción soluble y se les determinó su capacidad inhibitoria de la ECA (iECA) [20]. Esta actividad se utiliza usualmente como una herramienta de detección de compuestos antihipertensivos naturales [4].

Las fracciones solubles de las lías de las variedades de uvas tintas mostraron un mayor efecto inhibitorio sobre la ECA (29-56% utilizando un volumen de lías de 0,16 µL) respecto a las obtenidas a partir de la variedad blanca (< 10%). Las lías de las variedades Cabernet, Garnacha y Mazuela fueron las más activas (IC₅₀= 0,15, 0,22 y 0,21 µL, respectivamente) [18]. Pozo-Bayón *et al.* 2007 y Alcaide-Hidalgo *et al.* 2008, observaron actividades iECA similares en vinos tintos (Tempranillo) y blancos (Airén, Verdejo y Sauvignon Blanc), respectivamente [21,22]. Esta diferencia de actividad entre variedades de uva tintas y blancas se pudo deber a que las variedades tintas presentan mayor contenido en compuestos fenólicos que las variedades de uvas blancas [23]. Existe una amplia variedad de estudios que indican que muchos compuestos fenólicos presentes en las uvas pueden tener efectos inhibitorios sobre la ECA [11]. Además, es de destacar que las actividades iECA de los sobrenadantes de las lías de las variedades tintas fueron superiores a las observadas en leches fermentadas comerciales elaboradas con *Enterococcus faecalis* y *Lactobacillus helveticus* [24,25], lo cual destacaba el gran potencial de estos productos como posible antihipertensivo. Sin embargo,

hay que tener en cuenta que una alta actividad de iECA *in vitro* no siempre se correlaciona con una actividad antihipertensiva *in vivo*, ya que los compuestos bioactivos pueden modificarse durante la digestión gastrointestinal o no ser absorbidos. Además, es conocido que los compuestos fenólicos son ampliamente metabolizados, ya que las moléculas absorbidas son reconocidas como xenobióticos y pasan por una fase II de detoxificación enzimática. Además, muchos de ellos, no son absorbidos y llegan al colon, donde pueden ser metabolizados por la microbiota intestinal y sufrir reacciones de fase II [26].

Considerando estos hechos, se evaluó la actividad antihipertensiva de los tres sobrenadantes de lías de vino que mostraron la mayor actividad iECA (Cabernet, Garnacha y Mazuela) en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) tras su administración oral y aguda (5.0 mL/kg de peso corporal) [18]. Este modelo animal es considerado uno de los mejores modelos experimentales para evaluar el efecto antihipertensivo de fármacos y compuestos bioactivos, ya que el desarrollo de la HTA en estas ratas es muy similar a la desarrollada por los humanos [27]. Como controles se utilizaron otros dos grupos de animales a los que se les administró oralmente agua o captopril (50 mg/kg peso corporal; un fármaco antihipertensivo de la familia de los ECA inhibidores). La PAS y PAD se registró antes y después (2, 4, 8, 24, 48 h) de la administración de los productos en la cola por el método del manguito [28]. Los resultados mostraron que las propiedades antihipertensivas de las lías dependieron de la uva utilizada para elaborar el vino, ya que solamente las lías obtenidas en la elaboración de vino con uvas Cabernet redujo la PAS y PAD de los animales (-36 y -39 mmHg, respectivamente) [18]. El efecto antihipertensivo de este producto alcanzó su máximo de actividad a las 6 h post-administración y se prolongó hasta las 8 h después de su administración. Además, su efecto fue similar al producido en los animales a los que se les había administrado el fármaco Captopril, mostrando el gran potencial como antihipertensivo de este producto procedente de las lías de vino. Además, se descartó un posible efecto hipotensor (bajada de PA no deseada en un estado de PA normal) del sobrenadante de lías bioactivo cuando se administró a ratas Wistar Kyoto (WKY), que son el control normotenso de las ratas SHR [18]. Estos resultados indicaron que el efecto antihipertensivo de este sobrenadante de lías es específico de la condición hipertensiva.

Adicionalmente, se realizó otro estudio para evaluar la dosis más efectiva de este sobrenadante de lías de vino [29]. Es conocido que las funcionalidades biológicas de los compuestos fenólicos no siempre actúan de manera dosis dependiente [30]. Por lo tanto, el establecimiento de la dosis más eficaz se consideró fundamental para optimizar la eficacia y la fabricación de este producto antihipertensivo. Así, el sobrenadante de lías de vino de la variedad Cabernet se administró de forma oral y aguda a ratas SHR a tres dosis diferentes 2.5, 5.0 y 7.5 mL/kg de peso corporal y se registró variaciones en su PA, utilizando la misma metodología que se ha descrito anteriormente. Todas las dosis probadas produjeron un efecto antihipertensivo, reduciendo los valores de PAS y PAD. Las máximas disminuciones de PA se observaron a

las 6 h después de su administración (para PAS -28, -37 y -42 mm Hg, respectivamente para 2,5, 5,0 y 7,5 mL/kg y para PAD -35, -39, -49 mmHg, respectivamente para las tres dosis). El efecto reductor de la PA fue dependiente de la dosis hasta 5 mL/kg de peso corporal y no se encontraron diferencias significativas después de la administración de 5,0 y 7,5 mL/kg de peso corporal incluyendo todas las horas de medición [29]. Por lo tanto, 5 mL/kg se consideró como la dosis más eficaz. Estos resultados son de relevancia dado que una reducción de 10 mmHg para la PAS y 5 mmHg para la PAD produce una reducción significativa en el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares en humanos [31]. Así, estas evidencias señalan al gran potencial del sobrenadante de lías de vino para el control de la PA, sobre todo considerando que la dosis evaluada en ratas corresponde solamente a 73 mL para una persona de 70 kg [32].

2.2 Identificación de los compuestos fenólicos responsables de la bioactividad de las lías del vino

Dado el diferente efecto mostrado por los tres sobrenadantes de lías sobre la PA de los animales hipertensos, se investigó cuáles podrían ser los compuestos responsables de la actividad antihipertensiva mostrada por las lías de vino de la variedad Cabernet [18]. Existen muchas evidencias sobre los efectos beneficiosos de los compuestos fenólicos, como por ejemplo sus efectos cardioprotectores [33], en los que se incluye la actividad antihipertensiva [34]. Considerando que las lías de vino son ricas en estos compuestos, se estudió el perfil fenólico de las tres lías mediante UHPLC-ESI-Q-TOF-MS para comprender su diferente comportamiento reduciendo la PA.

Los resultados revelaron que el sobrenadante de lías obtenido con la uva Cabernet contenía el doble de compuestos fenólicos totales que las que tenían los sobrenadantes de lías de las variedades Mazuela o Garnacha (691, 395 y 380 mg/L, respectivamente) [18]. Las principales diferencias se encontraron en las familias de los flavanoles (331, 123 y 155 mg/L para Cabernet, Mazuela y Garnacha, respectivamente) y antocianinas (154, 75 y 51 mg/L para Cabernet, Mazuela y Garnacha, respectivamente). Por lo tanto, el efecto antihipertensivo de las lías de la variedad Cabernet se relacionó con estas dos familias. En concreto, los compuestos que se encontraron en mayor concentración en estas lías respecto a las otras dos variedades fueron los flavanoles: catequina, epicatequina y procianidinas y las antocianinas: malvidina-3-glucósido, malvidina-(6-acetil)-3-glucósido y malvidina-(6-cumaroil)-3-glucósido [18]. Diferentes estudios han relacionado la ingesta de alimentos o extractos ricos en flavanoles y antocianinas o el consumo de compuestos fenólicos, cuyos niveles estaban aumentados en las lías de la variedad de uva Cabernet, con una reducción en la PA o una acción cardioprotectora [35–41]. Por lo tanto, estos compuestos fenólicos podrían ser los responsables del efecto antihipertensivo de las lías de la variedad Cabernet.

Como se ha mencionado anteriormente, la composición fenólica de la fruta puede variar por diferentes factores, incluidas las condiciones de crecimiento de la planta, que pueden variar de un año a otro [19]. Por lo tanto, también se estudió la actividad iECA y antihipertensiva del sobrenadante de lías de vino (variedad de uva Cabernet) provenientes de dos cosechas diferentes (2017 y 2018). No se encontraron diferencias significativas en sus propiedades, lo que indicó una buena reproducibilidad de los efectos beneficiosos de estas lías [18].

2.3 Evaluación del efecto del alcohol en el efecto antihipertensivo de las lías de vino

Además de los compuestos fenólicos, el sobrenadante de las lías de vino contiene otros componentes como el etanol, que desaparecen en el proceso de secado. Este proceso sería necesario para la utilización de este sobrenadante como nutraceutico o ingrediente funcional. Diferentes estudios realizados con bebidas alcohólicas mostraron que el alcohol puede modificar la PA dependiendo de la dosis y la duración de la ingesta [42]. Por tanto, el secado del sobrenadante de lías, y su consecuente desalcoholización, podría modificar las propiedades antihipertensivas del mismo. Así, el siguiente objetivo fue investigar la actividad antihipertensiva del sobrenadante de lías obtenido con las uvas de la variedad Cabernet secado por liofilización (WLPW) [29]. La dosis administrada a las ratas SHR fue de 125 mg/kg de peso corporal que correspondía a la dosis más efectiva del sobrenadante (5 mL/kg) en producto seco. WLPW redujo la PA de los animales desde las 2 h después de su administración, alcanzando su máximo de actividad a las 6 h (-48 y -44 mmHg para PAS y PAD, respectivamente) y perduró hasta las 24 h después de su administración (-27 y -30 mmHg para PAS y PAD, respectivamente). Estos resultados mostraron que este producto seco tenía un mayor efecto antihipertensivo y más prolongado [29] que el sobrenadante de lías en formato líquido [18]. Estos resultados van en concordancia con estudios realizados con vino tinto desalcoholizado, el cual ejerció un potente efecto antihipertensivo en voluntarios con HTA en comparación con el vino tinto [43]. Por otro lado, es de destacar que la dosis de WLPW ensayada fue más baja que las utilizadas en otros estudios, donde administraron 375 mg/kg de peso corporal de extracto de semilla de uva rico en flavanoles a ratas SHR y que produjo similares efectos reductores sobre la PA de los animales [18]. Este hecho podría deberse a que otros compuestos fenólicos, además de los flavanoles, podrían participar en el efecto antihipertensivo del WLPW, como las antocianinas. Además, dado que el efecto antihipertensivo del WLPW fue incluso más potente que el del fármaco captopril, se consideró esencial descartar un posible efecto hipotensor en animales normotensos. Sin embargo, como se ha observado previamente para otros productos ricos en compuestos fenólicos [39,44–46], el efecto antihipertensivo del WLPW desalcoholizado fue específico del estado hipertenso, ya que no se observaron

efectos hipotensores en las ratas normotensas [29]. Estos resultados abren la puerta al uso potencial del WLPW como ingrediente funcional o nutraceutico para el control de la HTA.

2.4 Evaluación de los mecanismos involucrados en el efecto antihipertensivo de las lías de vino

Finalmente, se estudiaron los diferentes mecanismos que podrían estar involucrados en el efecto reductor de la PA producido por el WLPW [29,47]. Dado que el sobrenadante de lías de vino de la variedad de uva Cabernet se seleccionó debido a su alta actividad iECA, la inhibición de esta enzima se consideró como un mecanismo potencial involucrado en su efecto antihipertensivo [29]. Para ello, el producto (125 mg/kg de peso corporal) se administró a ratas SHR y se recogió sangre, hígado y aorta a las 6 h después de su administración (máximo punto de efectividad). Como control se utilizaron animales a los que se les administró agua. Tras obtener el plasma, se determinó su actividad ECA [48]. No se encontraron cambios en la actividad de la ECA plasmática de los animales que consumieron el WLPW respecto al grupo control [29]. Estos resultados podrían parecer contradictorios ya que el sobrenadante de las lías mostró actividad iECA *in vitro* [18]. Sin embargo, la falta de correspondencia entre su actividad iECA *in vitro* y su actividad ECA plasmática se ha observado también para otros extractos ricos en compuestos fenólicos, como el extracto de proantocianidinas de semilla de uva en ratas SHR o el extracto de piel de cebolla rico en quercetina en pacientes prehipertensos [39,49]. No obstante, los resultados de este estudio no descartan la implicación de la ECA en el efecto antihipertensivo del WLPW, actuando antes de las 6 h post-administración.

Por otro lado, es conocido que el estrés oxidativo está implicado en el desarrollo de la HTA [50]. El estrés oxidativo se refiere a un desequilibrio entre la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS, respectivamente) en las células y la capacidad de los sistemas biológicos para eliminarlas [51]. Dado que la actividad antioxidante es una de las más importantes bioactividades asociadas a los compuestos fenólicos [52], el WLPW podría exhibir su efecto antihipertensivo mejorando el estrés oxidativo de las ratas hipertensas. Así, se estudió el potencial efecto antioxidante del WLPW en ratas SHR a las 6 h después de la administración del mismo (125 mg/kg de peso corporal) determinando la concentración hepática de glutatión reducido (GSH) y ROS y de metabolitos de óxido nítrico (NO) y malondialdehído (MDA) en plasma. El GSH es considerado uno de los principales antioxidantes endógenos del organismo ya que contiene grupos sulfhidrilos que pueden oxidarse y reducirse fácilmente [53]. Los resultados mostraron que los animales que habían consumido el WLPW tenían un mayor contenido de GSH en el hígado con respecto a los animales no tratados (42 y 37 $\mu\text{mol/g}$ proteína, respectivamente) [29]. También se observó un aumento en los metabolitos de

NO en el plasma de estos animales tratados respecto a los controles (39 y 33 μM , respectivamente). El NO es el principal vasodilatador producido por el endotelio vascular, el cual es sintetizado a través de la oxidación de L-arginina a L- citrulina por la enzima nítrico sintasa endotelial (eNOS) [54]. Además, los niveles hepáticos de ROS fueron inferiores en estos animales tratados con WLPW respecto a los no tratados (4184 y 6454 AU/g de tejido, respectivamente), lo que podría estar asociado con el aumento en los niveles de NO encontrados en esos animales. Elevados niveles de ROS se han asociado con disfunción endotelial [45], dado que las ROS pueden reaccionar con el NO, formando peroxinitritos, provocando una reducción en la vasodilatación asociada al NO [55]. Además, excesiva concentración de ROS puede aumentar la peroxidación lipídica. MDA es producido por la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados con lipoproteínas de baja densidad [56] y es considerado un marcador de daño tisular y fallo de los mecanismos de defensa antioxidantes [50]. Además, está asociado con disfunción endotelial dado que inhibe la actividad y la expresión de la eNOS [57]. La administración de WLPW redujo la concentración de MDA plasmático respecto a los animales controles (38 y 35 nM, respectivamente) [29]. Por lo tanto, el WLPW ejerció su efecto antihipertensivo a través de la regulación del sistema redox y mejoró la biodisponibilidad de NO [29].

Además, se determinó la expresión génica de diferentes vasodilatadores y vasoconstrictores endoteliales en la aorta de los mismos animales. Se observó un incremento de 1.9 y 2.9 veces en los niveles de expresión de los genes *eNos* y *Sirtuina 1 (Sirt1)*, respectivamente [47]. SIRT-1 produce la activación de la eNOS mediante su deacetilación [58]. Así, el aumento en la expresión de *Sirt-1* por WLPW produciría un aumento de los niveles de eNOS activa y, consecuentemente, un aumento en los niveles de NO. Además, también se observó una reducción (-0.41 UA en la expresión génica relativa) de NADPH oxidasa 4 (*Nox-4*) [47], una de las principales enzimas responsables de la sobreproducción de ROS endotelial en la HTA [59,60]. Esto produciría una menor liberación de ROS, que contribuiría a aumentar la biodisponibilidad del NO. Finalmente, también se redujo la expresión génica de endotelina 1 (*Et1*) (-0.43 de expresión génica relativa), en los animales a los que se les había administrado el WLPW respecto a los controles [47]. ET1 es otro vasoconstrictor liberado por el endotelio, que está involucrado en hipertrofia vascular y procesos inflamatorios [61].

Considerando todos estos resultados la mejora de la disfunción endotelial y del estrés oxidativo asociado a la HTA podrían ser otros de los mecanismos involucrados en el efecto antihipertensivo de este producto.

3 Valorización de la fracción sólida de las lías de vino

3.1 Obtención de un producto antihipertensivo derivado de las lías de vino a través de la extracción asistida con enzimas

Como se ha mencionado anteriormente, el producto antihipertensivo elaborado a partir de las lías de vino se obtuvo a partir de la fracción soluble de las mismas, no utilizándose el residuo sólido de las lías. Los compuestos fenólicos pueden estar en la matriz alimentaria en forma libre o unidos covalentemente a sustancias solubles o insolubles [62]. Por ejemplo, los taninos, compuestos fenólicos presentes en los coproductos vitivinícolas, forman complejos con las proteínas [63]. Además, es conocido que la fracción sólida de las lías también contiene una gran cantidad de compuestos fenólicos [17]. Por lo tanto, la extracción de estos compuestos no solubles podría permitir la obtención de un producto a partir de las lías con mayor contenido en compuestos fenólicos y una funcionalidad mejorada. Se han descrito diferentes metodologías para facilitar la liberación de compuestos fenólicos de la matriz [64]. Entre ellas destaca la extracción asistida por enzimas, que es una alternativa más ecológica a los métodos convencionales de extracción basados en disolventes [65]. Esta técnica se basa en el uso de enzimas para descomponer diferentes componentes celulares, lo que potencia la liberación de compuestos fenólicos [66].

Considerando estas evidencias, las lías de vino obtenidas a partir de uvas de la variedad Cabernet se mezclaron con un preparado enzimático comercial de uso alimentario (Flavourzyme[®]). Tras 2 h de hidrólisis, la disolución se centrifugó y se recogió la fracción líquida (hidrolizado de lías). Como control del proceso, se utilizaron las mismas lías, sometidas al mismo tiempo de incubación, pero sin adición de enzima [67]. El perfil fenólico de ambas muestras se analizó por UHPLC-ESI-Q-TOF-MS. Los resultados mostraron que el proceso de hidrólisis incrementó un 57,20% el contenido fenólico presente en el hidrolizado de lías con respecto a las lías sin tratar (25 y 16 mg/g, respectivamente) [67]. Las antocianinas y los flavonoles fueron las familias fenólicas que más aumentaron su concentración tras la extracción enzimática, siendo el hidrolizado de lías resultante rico en flavonoles, antocianinas, ácidos fenólicos y flavonoles. Los compuestos fenólicos mayoritarios en el hidrolizado fueron el ácido gálico (3,5 mg/g), catequina (3,3 mg/g), malvidina-3-glucósido (3,3 mg/g), dímeros de procianidinas (2,6 mg/g), quercetina (2,0 mg/g), malvidina-(6-acetil)-3-glucósido (1,5 mg/g) y epicatequina (1,2 mg/g) [67].

Además, se evaluó la bioactividad del hidrolizado dado que los compuestos fenólicos eran los responsables de la actividad de las lías y que este hidrolizado presentaba un mayor contenido en estos compuestos [67]. El hidrolizado mostró una mayor actividad iECA (54 y 36%, respectivamente), actividad antioxidante (método 2,2-difenil-1-picrilhidracilo; $EC_{50} = 13$ y $8 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) y antihipertensiva que el sobrenadante de lías (control). La mejora de sus efectos antioxidantes se relacionó con el mayor contenido de compuestos fenólicos, sobre todo de antocianinas. En este sentido, se ha descrito una buena correlación entre las antocianinas y la actividad antioxidante para diferentes extractos obtenidos a partir de lías de vino [68]. En relación al efecto del hidrolizado sobre la PA en ratas SHR, una dosis única de 5 mL/kg de peso corporal del mismo mostró un efecto antihipertensivo, que fue más potente que el mostrado por las lías control (-36 y -33 mmHg a las 6 h después de la administración del hidrolizado o el control, respectivamente). Además, su efecto fue más prolongado que el mostrado por el fármaco Captopril y que el control de lías, manteniéndose hasta 48 h después de su administración [67]. Esta mejora del efecto antihipertensivo también estuvo ligada a la liberación de compuestos fenólicos durante la hidrólisis enzimática, principalmente flavanoles y antocianinas.

3.2 Identificación de péptidos antihipertensivos a partir del hidrolizado de lías de vino

El hidrolizado de lías de vino también presentó un mayor contenido en proteínas y en aminoácidos como Pro, Ile, Leu, Val y Trp respecto a las lías control [69]. Este hecho indica que durante el proceso de hidrólisis también se produjo la liberación de péptidos a la fracción soluble. Por lo tanto, el siguiente objetivo fue identificar posibles péptidos inhibidores de la ECA y/o antihipertensivos que estuvieran presentes en el hidrolizado de lías de vino [69]. Los péptidos presentes en el hidrolizado se separaron en dos etapas: i) en función de su tamaño molecular por ultrafiltración y ii) por su hidrofobicidad mediante cromatografía de líquidos en fase inversa (RP-HPLC). Posteriormente, se determinó la actividad iECA de las 9 fracciones obtenidas en el último proceso de separación. Cinco de ellas mostraron una actividad superior al 50 % determinado a la misma concentración de proteínas. Además, estas fracciones más activas se analizaron mediante nano-HPLC-(Orbitrap)MS/MS para identificar las secuencias peptídicas. Se identificaron seis secuencias de aminoácidos (FKTTDQQTRTTVA, NPKLVITV, TVTNPARIA, PAGELHP, LDSPSEGRAPG y LDSPSEGRAPGAD) en el hidrolizado. Todos estos péptidos se liberaron durante el proceso de hidrólisis de las lías de vino dado que estos péptidos no se encontraron en las lías sin hidrolizar [69]. Tras la síntesis química de estos péptidos, se evaluó su actividad iECA. Todos los péptidos mostraron un cierto efecto inhibitorio sobre la ECA *in vitro*; sin embargo, los péptidos TVTNPARIA, PAGELHP y LDSPSEGRAPG fueron los más activos ($IC_{50} = 15, 0,5$ y $18 \mu\text{M}$). Además, también se evaluó el

efecto antihipertensivo de los seis péptidos a una dosis aguda de 10 mg/kg de peso corporal en SHR. Todos los péptidos redujeron la PAS de los animales en más de 10 mmHg , a excepción del péptido PAGELHP que no mostró esta bioactividad [69]. Los más activos fueron los péptidos FKTTDQQTRTTVA y LDSPSEGRAPGAD que redujeron tanto la PAS (-28 y -24 mmHg , respectivamente) como la PAD desde las 2 h hasta las 8 h después de su administración. Los mayores efectos se observaron a las 6 h, alcanzando reducciones en la PAS de -28 y -24 mmHg , respectivamente para FKTTDQQTRTTVA y LDSPSEGRAPGAD y de PAD de -32 y -34 mmHg , respectivamente [69]. Similares efectos antihipertensivos se han observado en otros péptidos obtenidos a partir de alimentos [70–72].

Finalmente, se realizó un estudio *in silico* que reveló que todos los péptidos identificados en el hidrolizado de lías son susceptibles de ser hidrolizados por las proteasas gastrointestinales (tripsina, quimiotripsina o pepsina) [69]. Así que, los efectos antihipertensivos de estos péptidos probablemente no se deban a esos péptidos (secuencia completa) sino a fragmentos de los mismos, liberados durante el proceso gastrointestinal. Sin embargo, se requieren más estudios para demostrar qué secuencias de aminoácidos son las bioactivas, dado que el efecto antihipertensivo de los fragmentos resultantes no ha sido descrito.

Todos estos resultados demuestran que la extracción enzimática es una metodología útil para liberar compuestos fenólicos y péptidos antihipertensivos de las lías del vino. El hidrolizado resultante y los péptidos identificados podrían ser útiles para el control de la HTA.

4 Conclusiones

Este estudio muestra que las lías del vino pueden ser una buena fuente de compuestos antihipertensivos aunque depende del perfil/concentración de compuestos fenólicos que tengan. El proceso de extracción asistido con enzimas aplicado sobre las lías de vino fue un proceso eficaz para solubilizar compuestos fenólicos y péptidos capaces de reducir la PA, generando un producto con mayor bioactividad a la presentada por las lías sin tratar. El sobrenadante de lías secado y el hidrolizado de lías de vino, obtenidos durante este estudio, mostraron un potente efecto reductor tanto de la PAS como de la PAD y podrían ser útiles para prevenir el desarrollo de la HTA como nutraceuticos o ingredientes funcionales. Los péptidos identificados en el hidrolizado podrían también ser útiles para este fin dentro de la industria farmacológica. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para demostrar el efecto a largo plazo y en humanos de todos estos productos obtenidos a partir de las lías del vino. Finalmente, destacar que la obtención de estos compuestos de alto valor añadido a partir de las lías ayudaría a la valorización de las mismas, reduciendo los costes de su eliminación, reduciendo el impacto medioambiental y contribuiría al desarrollo de una economía circular en la industria vitivinícola.

Proyecto RTC-2017-6044-2 financiado por MCIN/AEI /10.13039/501100011033 y por FEDER Una manera de hacer Europa.

Bibliografía

1. World Health Organization (WHO) Hypertension Available online: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hypertension> (accessed on May 21, 2023)
2. Zhou, B.; Perel, P.; Mensah, G.A.; Ezzati, M. *Nat. Rev. Cardiol.* **18**, 785–802 (2021)
3. Mancia, G.; Zanchetti, A. *J. Hypertens.* **26**, 164–168 (2008)
4. Margalef, M.; Bravo, F.I.; Arola-Arnal, A.; Muguerza, B. In *Natural Products Targeting Clinically Relevant Enzymes*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 45–67 (2017)
5. Bravo, F.I.; Calvo, E.; López-Villalba, R.A.; Torres-Fuentes, C.; Muguerza, B.; García-Ruiz, A.; Morales, D. *Nutrients* **15**, 457 (2023)
6. Fraga, C.G.; Croft, K.D.; Kennedy, D.O.; Tomás-Barberán, F.A. *Food Funct.* **10**, 514–528 (2019)
7. Ibarz-Blanch, N.; Morales, D.; Calvo, E.; Ros-Medina, L.; Muguerza, B.; Bravo, F.I.; Suárez, M. *Nutrients* **14**, 1920 (2022)
8. Soubrier, F.; Cambien, F. *Trends Cardiovasc. Med.* **3**, 250–258 (1993)
9. Ben-Othman, S.; Jöodu, I.; Bhat, R. *Molecules* **25**, 510 (2020)
10. Banerjee, J.; Singh, R.; Vijayaraghavan, R.; MacFarlane, D.; Patti, A.F.; Arora, A. *Food Chem.* **225**, 10–22 (2017)
11. López-Fernández-Sobrino, R.; Torres-Fuentes, C.; Bravo, F.I.; Muguerza, B. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022**, 1–14, doi:10.1080/10408398.2022.2049202
12. Musee, N.; Lorenzen, L.; Aldrich, C. *J. Clean. Prod.* **15**, 417–431 (2007)
13. International Organisation of Vine and Wine 2019 Statistical report on world vitiviniculture (2019)
14. International Organisation of Vine and Wine 2022 Wine production OIV first estimates (2022)
15. Souza da Costa, B.; Soldevilla Muro, G.; Oliván García, M.; Motilva, M.-J. *LWT* **165**, 113774 (2022)
16. De Iseppi, A.; Lomolino, G.; Marangon, M.; Curioni, A. *Food Res. Int.* **137**, 109352 (2020)
17. Pérez-Bibbins, B.; Torrado-Agrasar, A.; Salgado, J.M.; Oliveira, R.P. de S.; Domínguez, J.M. *Waste Manag.* **40**, 72–81 (2015)
18. López-Fernández-Sobrino, R.; Soliz-Rueda, J.R.; Margalef, M.; Arola-Arnal, A.; Suárez, M.; Bravo, F.I.; Muguerza, B. *Nutrients* **13**, 679 (2021)
19. Eseberri, I.; Trepiana, J.; Léniz, A.; Gómez-García, I.; Carr-Ugarte, H.; González, M.; Portillo, M.P. *Nutrients* **14**, 1925 (2022)
20. Mas-Capdevila, A.; Iglesias-Carres, L.; Arola-Arnal, A.; Suarez, M.; Muguerza, B.; Bravo, F.I. *J. Funct. Foods* **55**, 28–35 (2019)
21. Alcaide-Hidalgo, J.M.; Martínez-Rodríguez, A.J.; Martín-Álvarez, P.J.; Pueyo, E. *Food Chem.* **111**, 965–969 (2008)
22. Pozo-Bayón, M.Á.; Alcaide, J.M.; Polo, M.C.; Pueyo, E. *Food Chem.* **100**, 43–47 (2007)
23. Mattivi, F.; Guzzon, R.; Vrhovsek, U.; Stefanini, M.; Velasco, R. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 7692–7702 (2006)
24. Muguerza, B.; Ramos, M.; Sánchez, E.; Manso, M.A.; Miguel, M.; Aleixandre, A.; Delgado, M.A.; Recio, I. *Int. Dairy J.* **16**, 61–69 (2006)
25. Fuglsang, A.; Nilsson, D.; Nyborg, N.C.B. *Society* **68**, 3566–3569 (2002)
26. Maqsood, S.; Adiamo, O.; Ahmad, M.; Mudgil, P. *Food Chem.* **308**, 125522 (2020)
27. Okamoto, K.; Aoki, K. *Jpn. Circ. J.* **27**, 282–293 (1963)
28. Buñag, R. *J. Appl. Physiol.* **34**, 279–282 (1973)
29. López-Fernández-Sobrino, R.; Soliz-Rueda, J.R.; Suárez, M.; Mulero, M.; Arola, L.; Bravo, F.I.; Muguerza, B. *Nutrients* **13**, 1142 (2021)
30. Calabrese, V.; Cornelius, C.; Trovato-Salinaro, A.; Cambria, M.; Locascio, M.; Rienzo, L.; Condorelli, D.; Mancuso, C.; De Lorenzo, A.; Calabrese, E. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 877–883 (2010)
31. Thomopoulos, C.; Parati, G.; Zanchetti, A. *J. Hypertens.* **32**, 2285–2295 (2014)
32. Reagan-Shaw, S.; Nihal, M.; Ahmad, N. *Faseb J.* **22**, 659–661 (2008)
33. Dell'Agli, M.; Buscialà, A.; Bosisio, E. *Cardiovasc. Res.* **63**, 593–602 (2004)
34. Durazzo, A.; Lucarini, M.; Souto, E.B.; Cicala, C.; Caiazza, E.; Izzo, A.A.; Novellino, E.; Santini, A. *Phyther. Res.* **33**, 2221–2243 (2019)
35. Wallace, T.C. *Adv. Nutr.* **2**, 1–7 (2011)
36. Igwe, E.O.; Charlton, K.E.; Roodenrys, S.; Kent, K.; Fanning, K.; Netzel, M.E. *Nutr. Res.* **47**, 28–43 (2017)
37. Heiss, C.; Jahn, S.; Taylor, M.; Real, W.M.; Angeli, F.S.; Wong, M.L.; Amabile, N.; Prasad, M.; Rassaf, T.; Ottaviani, J.I.; et al. *J. Am. Coll. Cardiol.* **56**, 218–224 (2010)
38. Fairlie-Jones, L.; Davison, K.; Fromentin, E.; Hill, A. *Nutrients* **9**, 908 (2017)
39. Quiñones, M.; Guerrero, L.; Suarez, M.; Pons, Z.; Aleixandre, A.; Arola, L.; Muguerza, B. *Food Res. Int.* **51**, 587–595 (2013)
40. Pons, Z.; Margalef, M.; Bravo, F.I.; Arola-Arnal, A.; Muguerza, B. *J. Funct. Foods* **24**, 164–172 (2016)
41. Bondonno, N.P.; Bondonno, C.P.; Blekkenhorst, L.C.; Considine, M.J.; Maghzal, G.; Stocker, R.; Woodman, R.J.; Ward, N.C.; Hodgson, J.M.; Croft, K.D. *Mol. Nutr. Food Res.* **62**, 1700674 (2018)
42. Arranz, S.; Chiva-Blanch, G.; Valderas-Martínez, P.; Medina-Remón, A.; Lamuela-Raventós, R.M.; Estruch, R. *Nutrients* **4**, 759–781 (2012)
43. Chiva-Blanch, G.; Urpi-Sarda, M.; Ros, E.; Arranz, S.; Valderas-Martínez, P.; Casas, R.; Sacanella, E.; Llorach, R.; Lamuela-Raventós, R.M.; Andres-Lacueva, C.; et al. *Circ. Res.* **111**, 1065–1068 (2012)
44. Lin, X.; Han, T.; Fan, Y.; Wu, S.; Wang, F.; Wang, C. *Life Sci.* **258**, 118106 (2020)
45. Tanito, M.; Nakamura, H.; Kwon, Y.W.; Teratani, A.; Masutani, H.; Shioji, K.; Kishimoto, C.; Ohira, A.; Horie, R.; Yodoi, J. *Antioxidants Redox Signal.*

- 6**, 89–97 (2004)
46. Del Pino-García, R.; Rivero-Pérez, M.D.; González-Sanjosé, M.L.; Croft, K.D.; Muñiz, P. *Food Funct.* **8**, 2444–2454 (2017)
47. López-Fernández-Sobrino, R.; Soliz-Rueda, J.R.; Ávila-Román, J.; Arola-Arnal, A.; Suárez, M.; Muguerza, B.; Bravo, F.I. *Antioxidants* **10**, 1073 (2021)
48. Mas-Capdevila, A.; Pons, Z.; Aleixandre, A.; Bravo, F.I.; Muguerza, B. *Nutrients* **10**, 1295 (2018)
49. Brüll, V.; Burak, C.; Stoffel-Wagner, B.; Wolfram, S.; Nickenig, G.; Müller, C.; Langguth, P.; Alteheld, B.; Fimmers, R.; Naaf, S.; et al. *Br. J. Nutr.* **114**, 1263–1277 (2015)
50. Uzun, H.; Karter, Y.; Aydin, S.; Çurgunlu, A.; Şimşek, G.; Yücel, R.; Vehiyd, S.; Ertürk, N.; Kutlu, A.; Benian, A.; et al. *J. Hum. Hypertens.* **18**, 523–528 (2004)
51. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*; Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Eds.; fifth.; Oxford University Press: Oxford, United Kingdom (2015)
52. Kruk, J.; Aboul-Enein, B.H.; Duchnik, E.; Marchlewicz, M. *J. Physiol. Sci.* **72**, 19 (2022)
53. Aoyama, K.; Nakaki, T. *Molecules* **20**, 8742–8758 (2015)
54. Förstermann, U.; Sessa, W.C. *Eur. Heart J.* **33**, 829–837 (2012)
55. Rubanyi, G.M.; Vanhoutte, P.M. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **250**, H822–H827 (1986)
56. Grisham, M.B.; Johnson, G.G.; Gautreaux, M.D.; Berg, R.D. *Methods* **7**, 84–90 (1995)
57. Li, D.; Mehta, J.L. *Endothel. J. Endothel. Cell Res.* **10**, 17–21 (2003)
58. Donato, A.J.; Magerko, K.A.; Lawson, B.R.; Durrant, J.R.; Lesniewski, L.A.; Seals, D.R. *J. Physiol.* **589**, 4545–4554 (2011)
59. Ray, R.; Murdoch, C.E.; Wang, M.; Santos, C.X.; Zhang, M.; Alom-Ruiz, S.; Anilkumar, N.; Ouattara, A.; Cave, A.C.; Walker, S.J.; et al. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1368–1376 (2011)
60. Konior, A.; Schramm, A.; Czesnikiewicz-Guzik, M.; Guzik, T.J. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 2794–2814 (2014)
61. Xu, D.; Emoto, N.; Giaid, A.; Slaughter, C.; Kaw, S.; DeWit, D.; Yanagisawa, M. *Cell* **78**, 473–485 (1994)
62. Shahidi, F.; Yeo, J.D. *Molecules* **21**, 1216 (2016)
63. Ozdal, T.; Capanoglu, E.; Altay, F. *Food Res. Int.* **51**, 954–970 (2013)
64. Hogervorst, J.C.; Miljić, U.; Puškaš, V. In *Handbook of Grape Processing By-Products*; Elsevier pp. 105–135 (2017)
65. Panja, P. *Curr. Opin. Food Sci.* **23**, 173–182 (2018)
66. Landbo, A.K.; Meyer, A.S. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3169–3177 (2001)
67. López-Fernández-Sobrino, R.; Margalef, M.; Torres-Fuentes, C.; Ávila-Román, J.; Aragonès, G.; Muguerza, B.; Bravo, F.I. *Antioxidants* **10**, 517, (2021)
68. Romero-Díez, R.; Rodríguez-Rojo, S.; Cocero, M.J.; Duarte, C.M.M.; Matias, A.A.; Bronze, M.R. *Food Chem.* **259**, 188–195 (2018)
69. Bravo, F.I.; Mas-Capdevila, A.; López-Fernández-Sobrino, R.; Torres-Fuentes, C.; Mulero, M.; Alcaide-Hidalgo, J.M.; Muguerza, B. *Food Chem.* **366**, 130690 (2022)
70. Alcaide-Hidalgo, J.M.; Romero, M.; Duarte, J.; López-Huertas, E. *Nutrients* **12**, 271 (2020)
71. Shobako, N.; Ogawa, Y.; Ishikado, A.; Harada, K.; Kobayashi, E.; Suido, H.; Kusakari, T.; Maeda, M.; Suwa, M.; Matsumoto, M.; et al. *A Mol. Nutr. Food Res.* **62**, 1700732 (2018)
72. Xia, Y.; Yu, J.; Xu, W.; Shuang, Q. *J. Dairy Sci.* **103**, 4919–4928 (2020)