

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA,
TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL**



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**“Estilbenos como una alternativa sostenible al anhídrido sulfuroso en vinos.
Evaluación de la toxicidad del extracto de estilbeno”**

Memoria que presenta la Graduada Concepción Medrano Padial
para optar al título de Doctor por la Universidad de Sevilla con la Mención Internacional

Sevilla, 2020

*Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina
Legal
Área de Toxicología
Facultad de Farmacia*



C/ Profesor García González, 2.
41012 Sevilla (España)
Teléfono: 954 55 6762
Fax: 954 55 64 22

D^a M^a CARMEN GARCÍA PARRILLA, Catedrática de Universidad y
Directora del Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología
y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla,

INFORMA: Que la Tesis Doctoral titulada “ESTILBENOS COMO
UNA ALTERNATIVA AL ANHÍDRIDO SULFUROSO EN VINOS.
EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DEL EXTRACTO DE
ESTILBENO”, presentada por la Graduada CONCEPCIÓN
MEDRANO PADIAL para optar al grado de Doctor por la Universidad
de Sevilla con la Mención Internacional, ha sido realizada en el Área de
Toxicología de este Departamento bajo la dirección de la Dra. Silvia
Pichardo Sánchez y la Dra. María Puerto Rodríguez. Así mismo,
informa la estancia internacional predoctoral llevada a cabo en
University of Nottingham bajo la dirección del Dr. Pavel Gershkovich.

Y para que conste, firmo el presente en Sevilla, a 21 de diciembre de
2020.

M^a Carmen García Parrilla.





C/ Profesor García González, 2.
41012 Sevilla (España)
Teléfono: 954 55 6762
Fax: 954 55 64 22

D^a SILVIA PICHARDO SÁNCHEZ y D^a MARÍA PUERTO RODRÍGUEZ, Profesoras Titulares del Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla,

INFORMAN:

Que siendo directoras de la Tesis Doctoral de la Graduada D^a CONCEPCIÓN MEDRANO PADIAL, con título “Estilbenos como una alternativa sostenible al anhídrido sulfuroso en vinos. Evaluación de la toxicidad del extracto de estilbeno”, AVALAN la idoneidad de la presentación de la misma en la modalidad de COMPENDIO POR PUBLICACIONES, e INDICAN que las aportaciones publicadas o aceptadas para su publicación cumplen los criterios de la evaluación publicada por la CNEAI, así:

-El trabajo “**In Vitro Toxicity Assessment of Stilbene Extract for Its Potential Use as Antioxidant in the Wine Industry**” fue publicado en la revista Antioxidants con un índice de impacto de 5.014, y un JCR de (i) Q1 (56/297) en BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY, (ii) Q1 (7/61) en MEDICINAL CHEMISTRY y (iii) Q1 y D1 (10/139) en FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY.

-El trabajo “**Cytotoxicity studies of a stilbene extract and its main components intended to be used as preservative in the wine industry**” fue publicado en la revista en la revista Food Research International con un índice de impacto de 4.972, y un JCR de Q1 y D1 (11/139) en FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY.

Y para que así conste a los efectos oportunos, se firma en Sevilla, a 21 de Diciembre de 2020.

Dra. Silvia Pichardo Sánchez.



Dra. María Puerto Rodríguez.

**Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina
Legal
Área de Toxicología
Facultad de Farmacia**

C/ Profesor García González, 2.
41012 Sevilla (España)
Teléfono: 954 55 6762
Fax: 954 55 64 22



D^a SILVIA PICHARDO SÁNCHEZ y D^a MARÍA PUERTO RODRÍGUEZ, Profesoras
Titulares del Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de
la Universidad de Sevilla,

INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Estilbenos como una alternativa sostenible al anhídrido sulfuroso en vinos. Evaluación de la toxicidad del extracto de estilbeno.” ha sido realizada por la Graduada CONCEPCIÓN MEDRANO PADIAL en el Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla, bajo su dirección y que reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar a la mención de Doctorado Internacional por la Universidad de Sevilla.

Y para que conste, firman el presente en Sevilla, a 21 de diciembre de 2020.

Dra. Silvia Pichardo Sánchez.



Dra. María Puerto Rodríguez.

*Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina
Legal
Área de Toxicología
Facultad de Farmacia*

C/ Profesor García González, 2.
41012 Sevilla (España)
Teléfono: 954 55 6762
Fax: 954 55 64 22



Este trabajo ha sido realizado en el Área de Toxicología del Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicinal Legal de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, y se ha financiado con el siguiente Proyecto de Investigación:

- Estilbenos como una alternativa sostenible al anhídrido sulfuroso en vinos.
Evaluación de la toxicidad del extracto de estilbeno (RTA2015-00005-C02-02).

Así mismo, para la realización de la estancia en el extranjero, la Doctoranda Concepción Medrano Padial ha disfrutado de una Ayuda de Movilidad Internacional de estudiantes de la Universidad de Sevilla para realizar Prácticas Internacional en el marco del programa ERASMUS + (Curso 2019-2020).

ÍNDICE

INDEX

ÍNDICE / INDEX

I.	RESUMEN /SUMMARY	1
II.	INTRODUCCIÓN /INTRODUCTION	13
1.	Importancia del sector vitivinícola.	13
2.	Aplicaciones del sulfuroso en el vino. Características y propiedades.	14
2.1.	Efectos sobre la salud.	17
2.2.	Alternativas a su uso en enología.	18
3.	Características y propiedades de los estilbenos.	23
3.1.	<i>Trans</i> -resveratrol.	25
3.2.	<i>Trans</i> - ϵ -viniferina.	26
3.3.	Combinación de estilbenos.	27
4.	Características y propiedades de extractos naturales de plantas ricos en estilbenos.	28
5.	Proceso de autorización de estilbenos y extractos naturales como aditivo alimentario.	29
5.1.	Estudios toxicológicos necesarios para comercializar aditivos.	31
6.	Evaluación toxicológica de estilbenos y extractos naturales ricos en estilbenos <i>in vitro</i> .	32
6.1.	Toxicocinética.	32
6.2.	Citotoxicidad basal y estudios morfológicos.	33
6.3.	Estrés oxidativo.	35
6.4.	Genotoxicidad y mutagenicidad.	37
7.	Evaluación toxicológica de estilbenos y extractos naturales ricos en estilbenos <i>in vivo</i> .	42
7.1.	Toxicocinética.	42
7.2.	Toxicidad subcrónica y crónica y carcinogenicidad.	43
7.3.	Genotoxicidad.	44
8.	Otros estudios de toxicidad.	45
III.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS/ SIGNIFICANCE AND PURPOSES	48
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN / RESULTS AND DISCUSSION	59
	CAPÍTULO 1 / CHAPTER 1: TOXICOLOGICAL EVALUATION OF PICEATANNOL, PTEROSTILBENE AND ϵ-VINIFERIN FOR THEIR POTENTIAL USE IN THE FOOD INDUSTRY: A REVIEW.	61
	CAPÍTULO 2 /CHAPTER 2: IN VITRO TOXICITY ASSESSMENT OF STILBENE EXTRACT FOR ITS POTENTIAL USE AS ANTIOXIDANT IN THE WINE INDUSTRY	138
	CAPÍTULO 3 / CHAPTER 3: CYTOTOXICITY STUDIES OF A STILBENE EXTRACT AND ITS MAIN COMPONENTS INTENDED TO BE USED AS PRESERVATIVE IN THE WINE INDUSTRY.	157
	CAPITULO 4 / CHAPTER 4: PROTECTION AND REVERSION ROLE OF A PURE STILBENE EXTRACT FROM GRAPEVINE SHOOT AND ITS MAJOR COMPOUNDS AGAINST OXIDATIVE STRESS.	176
	CAPÍTULO 5 / CHAPTER 5: MUTAGENIC AND GENOTOXIC POTENTIAL ASSESSMENT OF A PURE STILBENE EXTRACT BY <i>IN VITRO</i> STUDIES.	213
	CAPÍTULO 6 /CHAPTER 6: <i>IN VIVO</i> GENOTOXICITY OF STILBENE EXTRACT INTENDED TO BE USED AS NATURAL ADDITIVE: A COMBINATION OF THE MICRONUCLEUS TEST AND THE COMET ASSAY.	250
V.	DISCUSIÓN GENERAL / GENERAL DISCUSSION	288
VI.	CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	308
VII.	REFERENCIAS / REFERENCES	313

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS / FIGURES AND TABLES INDEX

Figura 1. Distribución territorial de la superficie de viñedo. _____	13
Figura 2. Países con mayor superficie vitícola. _____	13
Figura 3. Estructura molecular del SO_2 . _____	15
Figura 4. Equilibrio químico entre SO_2 , HSO_3^- y SO_3^{2-} . _____	15
Figura 5. Estructura molecular de los estilbenos. _____	23
Figura 6. Estructura molecular del trans-resveratrol. _____	25
Figura 7. Estructura molecular de la trans- ϵ -viniferina _____	26
Figura 8. Pruebas de toxicidad por niveles para aditivos alimentarios. _____	31
Figura 9. Visualización de resultados del Test de Ames. _____	38
Figura 10. Visualización del ensayo de MN. _____	39
Figura 11. Esquema de la estrategia de pruebas de genotoxicidad recomendada por la EFSA. _____	40
Figura 12. Visualización del ensayo cometa. _____	41
Tabla 1. Ventajas y desventajas del SO_2 . _____	16
Tabla 2. Ventajas y desventajas de los tratamientos físicos como alternativas al SO_2 . _____	21
Tabla 3. Ventajas y desventajas de los tratamientos químicos como alternativas al SO_2 . _____	22

ÍNDICE DE ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS INDEX

- ADME:** absorción, distribución, metabolismo y excreción.
- ADN:** ácido desoxirribonucleico.
- AECOSAN:** Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición.
- ANS:** Aditivos Alimentarios y Fuentes de Nutrientes añadidos a los alimentos.
- CBMN:** células binucleadas con micronúcleos.
- CE:** Comisión Europea.
- CITIUS:** Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla.
- EC₅₀:** concentración efectiva media.
- EFSA:** Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.
- EGF:** factor de crecimiento epidérmico.
- Endo-III:** endonucleasa III.
- EOGRTS:** Estudio extendido de toxicidad reproductiva de una generación.
- ERO:** especies reactivas de oxígeno.
- FPG:** formamidopirimidina ADN glicosilasa.
- GSH:** glutathione.
- h:** horas.
- H₂O₂:** peróxido de hidrógeno.
- H₂S:** sulfuro de hidrógeno.
- HSO₃⁻:** ión bisulfito.
- I+D:** Investigación y Desarrollo.
- I+D+i:** Investigación, desarrollo e innovación.
- IDA:** Ingesta Diaria Máxima.
- IFAPA:** Instituto de Formación e Investigación Agraria y Pesquera.
- IM:** índice de mutagenicidad.
- kg:** kilogramo.
- L:** litro.
- mg:** miligramo.
- mL:** mililitro.
- MN:** micronúcleos.
- MS:** espectrómetro de masa.
- MTS:** 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium.
- MTT:** bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.
- NOAEL:** Dosis más elevada de una sustancia sin efecto adverso observable (No-Observed-Adverse-Effect-Level).
- OCDE:** Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico.
- OIV:** Organización Mundial de la Viña y el Vino.
- OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- PIB:** Producto Interior Bruto.
- PT:** Proteínas totales.

RD: Real Decreto.

RN: Rojo Neutro.

S9: fracción metabólica externa.

SO₂: dióxido de azufre.

SO₃²⁻: ión sulfito.

ST-99: Extracto con una riqueza del 99% en estilbenos procedente de subproductos de la vid.

TK: Gen de la timidina kinasa.

TNF- α : factor de necrosis tumoral- α .

UE: Unión Europea.

UPLC: Cromatografía Líquida de alta presión.

μ g: microgramo.

I. RESUMEN

SUMMARY

La demanda de los consumidores por alimentos cada vez más naturales está creando una tendencia creciente en la industria alimentaria hacia el empleo de ingredientes y aditivos naturales como alternativa a los conservantes químicos. En este sentido, la búsqueda de alternativas al uso del dióxido de azufre (SO₂) en la industria del vino es un campo en auge. Una de las estrategias que se ha encontrado para cubrir esta necesidad ha sido el uso de estilbenos debido a sus interesantes propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Además, estos compuestos se encuentran de forma natural en los sarmientos de la vid, subproductos de la industria vitinícola con valor añadido nulo actualmente. La posibilidad de incrementar el valor añadido de los subproductos que se producen en las bodegas es de gran interés, ya que se estima que se generan entre 2 y 4 toneladas por hectárea de viñedo y año, según datos recientes de la Organización Mundial de la Viña y el Vino (OIV).

El empleo de estas sustancias en la industria alimentaria debe ser seguro para los consumidores. En este sentido, hemos revisado la bibliografía existente relacionada con estudios de toxicidad *in vitro* e *in vivo* de tres estilbenos: piceatanol, pterostilbeno y ϵ -viniferina. Estos compuestos fueron escogidos debido a que se encuentran de manera abundante en la naturaleza y poseen propiedades biológicas interesantes para su uso en alimentos. Sin embargo, hasta el momento, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) no ha publicado ninguna evaluación de estos compuestos para garantizar su seguridad como aditivos. En esta revisión, se puso de manifiesto que estos estilbenos presentan una importante citotoxicidad en líneas celulares cancerígenas y no cancerígenas. Además, el daño en el ADN inducido por estos compuestos se ha demostrado por varios métodos como un posible mecanismo de citotoxicidad. Sin embargo, el potencial genotóxico *in vitro* del piceatanol, pterostilbeno y la ϵ -viniferina se ha estudiado poco y no se han realizado estudios siguiendo las directrices de la EFSA. En cuanto a los efectos *in vivo*, no existen estudios que valoren el potencial genotóxico en modelos *in vivo* ya que la mayoría de los autores se han centrado en sus propiedades beneficiosas. Por lo tanto, para garantizar la seguridad del uso de piceatannol, pterostilbeno y ϵ -viniferina, se necesitan más estudios de acuerdo con las recomendaciones de la EFSA que evalúen los efectos genotóxicos *in vitro* e *in vivo*. Esta revisión ha dado lugar a la siguiente publicación:

- **TOXICOLOGICAL EVALUATION OF PICEATANNOL, PTEROSTILBENE AND ϵ -VINIFERIN FOR THEIR POTENTIAL USE IN THE FOOD INDUSTRY: A REVIEW**
(Medrano-Padial et al., 2021. *Food Control* (en revision)).

La presente tesis doctoral se engloba dentro de un proyecto coordinado con el grupo del Instituto de Formación e Investigación Agraria y Pesquera (IFAPA) de la Dra. Emma Cantos-Villar, quienes obtuvieron y caracterizaron dos extractos procedentes de subproductos de la industria vitivinícola, con una riqueza de 45.4% y 99% en estilbenos, con el fin de utilizarlos como sustitutos totales o parciales del SO₂ en el vino. Para garantizar la seguridad de estos extractos se llevaron a cabo los ensayos recomendados por la EFSA, siendo el primer paso la realización de distintos ensayos *in vitro*. Además, también se estudiaron sus estilbenos mayoritarios (*trans-ε-viniferina* y *trans-resveratrol*) y su mezcla en la misma proporción que en el extracto de mayor riqueza (1:3.9) para comprender sus mecanismos de acción en más profundidad.

Esta evaluación se realizó teniendo en cuenta que la vía oral será la preferente para estos extractos puesto que la exposición ocurrirá a través del vino. Así pues, se escogieron dos líneas celulares del aparato digestivo: las células de hepatocarcinoma humano HepG2, ya que el hígado es el principal órgano de biotransformación, y las células de adenocarcinoma de colon humano Caco-2, por ser el intestino el órgano que se ocupa de la absorción y donde existe mayor tiempo de contacto con las sustancias ingeridas.

En primer lugar, el estudio de los efectos de ambos extractos, sus compuestos mayoritarios y su mezcla se llevó a cabo mediante ensayos de citotoxicidad y análisis de la morfología celular. Los ensayos de citotoxicidad se realizaron evaluando la afectación de tres biomarcadores (ensayo de la sal de tetrazolio (3- [4,5, dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio) (MTS), ensayo del rojo neutro (RN) y contenido proteico (PT)) y nos permitieron conocer la concentración efectiva media (EC₅₀) tras 24 y 48 h de exposición. Además, los efectos ultraestructurales causados en las células por estos compuestos se evaluaron observando su morfología. Los resultados obtenidos indicaron que ambos extractos y la mezcla de sus compuestos mayoritarios poseen una citotoxicidad parecida en ambas líneas celulares dando lugar a vacuolas de lípidos, núcleos apoptóticos y aberraciones mitóticas. Sin embargo, la *trans-ε-viniferina* produjo la muerte celular de manera más potente y a concentraciones más bajas que los demás compuestos ensayados. Por último, el *trans-resveratrol* tan sólo produjo una leve citotoxicidad tras 48 h de exposición.

Por otro lado, una vez analizada la citotoxicidad y los cambios morfológicos producidos por estos compuestos, realizamos un estudio de isobogramas con el fin de conocer el tipo de interacción entre la *trans-ε-viniferina* y el *trans-resveratrol*. Según la bibliografía disponible, es la primera vez que se ha usado este ensayo para estudiar la interacción entre estos dos compuestos. Los resultados indicaron que estos compuestos presentan un efecto antagónico.

Por otra parte, debido a que los estilbenos poseen una gran actividad antioxidante, se realizó un estudio del estrés oxidativo de las células HepG2 y Caco-2 tras la exposición de estos compuestos, ya que las sustancias antioxidantes pueden tener un carácter prooxidante dependiendo de la línea celular estudiada, concentración y condiciones de exposición. Para ello, evaluamos el contenido en especies reactivas de oxígeno (ERO) y el contenido en glutation (GSH) de ambas líneas celulares expuestas a ambos extractos, *trans-ε*-viniferina, *trans*-resveratrol y su mezcla. Además, para completar estos resultados, se estudió la capacidad de estos compuestos tanto para proteger como para revertir el daño producido por un agente oxidante. Los datos obtenidos en estos ensayos indican que ambos extractos, la *trans-ε*-viniferina y su mezcla con *trans*-resveratrol poseen interesante actividad antioxidante, mientras que el *trans*-resveratrol de manera individual no fue capaz de modular el estrés oxidativo en estas células.

Esta batería de ensayos *in vitro* dio lugar a las siguientes publicaciones:

- **IN VITRO TOXICITY ASSESSMENT OF STILBENE EXTRACT FOR ITS POTENTIAL USE AS ANTIOXIDANT IN THE WINE INDUSTRY** (*Medrano-Padial et al., 2019; Antioxidants, 8, 467*).
- **CYTOTOXICITY STUDIES OF A STILBENE EXTRACT AND ITS MAIN COMPONENTS INTENDED TO BE USED AS PRESERVATIVE IN THE WINE INDUSTRY** (*Medrano-Padial et al., 2020; Food Research International, 137, 109738*).
- **PROTECTION AND REVERSION ROLE OF A PURE STILBENE EXTRACT FROM GRAPEVINE SHOOT AND ITS MAJOR COMPOUNDS AGAINST AN INDUCED OXIDATIVE STRESS** (*Medrano-Padial et al., 2020; Journal of Functional Foods (en revision)*).

A continuación, siguiendo las recomendaciones de la EFSA para la evaluación de sustancias para su posible uso como aditivos, el siguiente paso es la realización de ensayos de mutagenicidad y genotoxicidad. Para ello, decidimos escoger el extracto con mayor riqueza en estilbenos (ST-99) ya que presentó el mejor perfil toxicológico y tecnológico. Además, se demostró que el uso de este extracto no modificó las propiedades sensoriales ni alteró la calidad del vino tinto.

Los ensayos recomendamos por la EFSA son dos: el test de Ames y el ensayo de micronúcleos (MN). En el test de Ames evaluamos el potencial mutagénico del extracto en cinco cepas de *Salmonella typhimurium* en concentraciones desde 48 a 5000 µg/placa. En este ensayo, no se observaron diferencias significativas a ninguna de las concentraciones

ensayadas, en presencia o en ausencia de la fracción microsómica S9. Por otro lado, el ensayo de MN en células L5178Y TK^{+/+} nos permitió conocer el potencial de este extracto para producir MN que contengan fragmentos o cromosomas enteros. Los resultados indicaron que en ausencia de S9 ninguna de las concentraciones del extracto ST-99 ensayadas (4-64 µg/mL) produjo un aumento en la frecuencia de células binucleadas con MN (CBMN). Sin embargo, sí se observó un aumento de CBMN en presencia de S9 después de la exposición a la concentración más alta estudiada (3.45-60 µg/mL).

Para completar esta evaluación, decidimos realizar el ensayo cometa estándar y modificado con la enzima formamidopirimidina glicosilasa (FPG). Esta técnica nos permitió conocer que el extracto ST-99 no produce rotura directa de la hebra de ADN ni oxidación de las bases purinas. Además, evaluamos la capacidad del extracto para proteger y revertir el daño oxidativo producido en el ADN por H₂O₂ y Ro19-8022. Los resultados indican que este efecto fue contrarrestado a las concentraciones más altas ensayadas en las células HepG2 y Caco-2 (EC₅₀).

Los datos obtenidos en estos tres ensayos fueron incluidos en el siguiente trabajo:

- **MUTAGENIC AND GENOTOXIC POTENTIAL ASSESSMENT OF A PURE STILBENE EXTRACT BY IN VITRO STUDIES** (*Medrano-Padial et al., 2021. Food and Chemical toxicology (en revision).*)

Posteriormente, teniendo en cuenta los resultados contradictorios de genotoxicidad del extracto ST-99 *in vitro*, siguiendo las recomendaciones de la EFSA, se procedió al estudio del potencial genotóxico *in vivo* del extracto. Para ello, realizamos un estudio combinando el ensayo de MN en médula ósea y el ensayo cometa en hígado, estómago y sangre, tanto estándar como modificado con las enzimas FPG y Endonucleasa III (Endo-III). Los resultados obtenidos indican que el extracto no causa rotura ni oxidación en el ADN en ninguno de los tejidos estudiados. Por otro lado, en el ensayo de MN, tanto la relación entre eritrocitos policromáticos y normocromáticos como el número de MN en eritrocitos policromáticos fueron similares en las ratas control y las tratadas, indicando que nuestro extracto no produce daño a nivel de médula ósea. Además, para completar estos resultados, se realizó un estudio histopatológico de la afectación del hígado y estómago, indicándose que tan sólo a la concentración más alta ensayada, la cual es 100 veces superior a la dosis que llegaría al consumidor (360 µg/mL), se detectaron leves daños. Además, según las recomendaciones de la OCDE, la ausencia de toxicidad debe ser corroborada con algún método que confirme que los tejidos diana han sido expuestos a la sustancia de estudio (OCDE 474 y OCDE 489). Por ello, llevamos a cabo una cromatografía líquida de ultra alta

presión acoplada a un espectrómetro de masas (UPLC-HESI-MS) como técnica para demostrar presencia de los estilbenos y sus derivados en muestras biológicas. Los resultados indican que tanto la *trans*- ϵ -viniferina como el *trans*-resveratrol y sus derivados están presentes en sangre. Estos datos se recogen en la siguiente publicación:

- **IN VIVO GENOTOXICITY OF STILBENE EXTRACT INTENDED TO BE USED AS NATURAL ADDITIVE: A COMBINATION OF THE MICRONUCLEUS TEST AND THE COMET ASSAY** (*título provisional*).

Consumer's demand for food with high nutritional quality, natural characteristics, microbiologically safe and minimally processed have increased, leading companies to adopt new techniques of food preservation as alternatives to the traditional ones. Moreover, due to the many side effects of sulphur dioxide (SO₂), its substitution in wines for natural compounds is of great interest. In this sense, one of the strategies that the industry has found to meet this need is the use of stilbenes because of their interesting antimicrobial and antioxidant properties. In addition, these compounds are found naturally in grapevine shoots. The possibility of increasing the added value of these by-products is of great interest, since it is estimated that between 2 and 4 tons per hectares of vineyard and year of by-products are generated, according to recent data from the International Organisation of Vine and Wine (OIV).

The use of these substances in the food industry must be safe for consumers. In this sense, we have reviewed the existing literature related to *in vitro* and *in vivo* toxicity studies of three stilbenes: piceatannol, pterostilbene and ϵ -viniferin. These compounds are abundantly found in nature and have interesting biological properties. However, so far, European Food Safety Authority (EFSA) has not published any evaluation of these compounds to ensure their safety as additives. In this review, it was reported that these stilbenes exhibit significant cytotoxicity in cancer and non-cancer cell lines. Furthermore, the DNA damage induced by these compounds has been demonstrated by various methods as a possible mechanism of cytotoxicity. However, the *in vitro* genotoxic potential of piceatannol, pterostilbene and ϵ -viniferin has been poorly evaluated and no studies have been conducted following the EFSA guidelines. Regarding the *in vivo* effects, there are no studies assessing the genotoxic potential of these stilbenes in *in vivo* models since most of the authors have focused on their beneficial properties. Therefore, to ensure the safe use of piceatannol, pterostilbene and ϵ -viniferin, further studies are needed following EFSA recommendations evaluating their genotoxic effects *in vitro* and *in vivo*. This review is included in the following publication:

- **TOXICOLOGICAL EVALUATION OF PICEATANNOL, PTEROSTILBENE AND ϵ -VINIFERIN FOR THEIR POTENTIAL USE IN THE FOOD INDUSTRY: A REVIEW**
(Medrano-Padial et al., 2021. *Food Control* (under revision))

This doctoral thesis is included in a project coordinated with the group of Dra. Emma Cantos-Villar from Instituto de Formación e Investigación Agraria y Pesquera (IFAPA). This group obtained and characterized two extracts from by-products of the wine industry with a 45.4% and 99% (ST-99) of richness in stilbenes to substitute SO₂ in wines. Following the

EFSA recommendations for the evaluation of possible additives, the objective of this thesis was to assess the toxicity of these two natural extracts beginning with *in vitro* assays. Moreover, their main stilbenes (*trans*- ϵ -viniferin and *trans*-resveratrol), and their combination in the same proportion as in the richest extract (1:3.9) were also studied to understand their mechanisms of action.

In order to design the toxicological evaluation, the experimental models were chosen to represent oral exposure to these substances taking into account that consumers will be exposed to them through wine. Thus, the selected cells were the human hepatocarcinoma cells HepG2, since the liver is the main organ of biotransformation, and human colon adenocarcinoma cells Caco-2, as the intestine is the organ that it deals with absorption and where there is a longer contact time with ingested substances.

The study of the effects of both extracts, their main compounds and their mixture was performed through cytotoxicity tests and analysis of cell morphology. Three biomarkers (tetrazolium salt assay (3- [4, 5, dimethylthiazol-2-yl] -5- [3-carboxymethoxyphenyl] -2- [4-sulfophenyl] -2H-tetrazolium) (MTS), neutral red uptake and protein content) were selected to evaluate the cytotoxicity of these compounds and obtained the effective mean concentration (EC_{50}) after 24 and 48 hours of exposure. The results obtained indicated that both extracts, and the mixture of their major compounds have similar cytotoxicity in both cell lines, giving rise to lipid vacuoles, apoptotic nuclei and mitotic aberrations. However, *trans*- ϵ -viniferin caused cell death more potently and at lower concentrations. Finally, *trans*-resveratrol produced only slight cytotoxicity after 48 h of exposure.

The interaction between *trans*- ϵ -viniferin and *trans*-resveratrol was assessed by an isobologram study. According to the available literature, this is the first time that this assay has been used to study the interaction between these two compounds. The results indicated that these stilbenes have an antagonistic effect.

The stilbenes are strong antioxidants, but since antioxidant substances can have pro-oxidant activity depending on the cell lines and exposure conditions, a study of the oxidative stress produced by both extracts, *trans*- ϵ -viniferin, resveratrol and their mixture was performed, evaluating the content of reactive oxygen species (ROS) and glutathione (GSH) in HepG2 and Caco-2 cells. In addition, to complete these results, the ability of these compounds to protect and reverse the damage caused by an oxidizing agent was studied. The data obtained in these assays indicated that both extracts, *trans*- ϵ -viniferin and its mixture with *trans*-resveratrol have interesting antioxidant activities, while *trans*-resveratrol did not modulate the oxidative stress produced in these cells.

This battery of *in vitro* tests leads to the following publications:

- **IN VITRO TOXICITY ASSESSMENT OF STILBENE EXTRACT FOR ITS POTENTIAL USE AS ANTIOXIDANT IN THE WINE INDUSTRY** (*Medrano-Padial et al., 2019; Antioxidants, 8, 467*)
- **CYTOTOXICITY STUDIES OF A STILBENE EXTRACT AND ITS MAIN COMPONENTS INTENDED TO BE USED AS PRESERVATIVE IN THE WINE INDUSTRY** (*Medrano-Padial et al., 2020; Food Research International, 137, 109738*)
- **PROTECTION AND REVERSION ROLE OF A PURE STILBENE EXTRACT FROM GRAPEVINE SHOOT AND ITS MAJOR COMPOUNDS AGAINST AN INDUCED OXIDATIVE STRESS** (*Medrano-Padial et al., 2020; Journal of Functional Foods (under revision)*).

According to the results obtained *in vitro*, the extract ST-99 presented a better toxicological and technological profile than the rest of the tested compounds. Moreover, the use of this extract did not compromise the quality and sensory properties of wines. For these reasons, we continue the evaluation with this extract.

The next step, following the EFSA recommendations, is the assesment of the mutagenic and genotoxic potential of the ST-99 extract. There are two assays recommended by EFSA for the genotoxic evaluation of additives: the Ames test and the micronucleus (MN) assay. No mutagenic potential was exhibited by the extract at concentrations ranging from 48 to 5000 µg/ plate in any of the five strains of *Salmonella typhimurium* used either in presence or absence of the microsomal fraction S9. On the other hand, the MN assay in L5178Y TK +/- cells allowed us to know the potential of this extract to produce MN containing fragments or whole chromosomes. The results indicated that in the absence of S9 none of the concentrations tested (4-64 µg/mL) increased the frequency of binucleated cells with MN (BNMN). However, an increase in BNMN was observed in the presence of S9 after the exposure of the highest concentration studied (3.45-60 µg/mL).

In order to complete the genotoxicity studies, we decided to perform the standard and modified comet assay with the enzyme formamidopyrimidine glycosylase (FPG) to complete this evaluation. The ST-99 extract did not produce direct breakage of the DNA strand or oxidation of the purine bases. In addition, the highest concentration of ST-99 tested (EC₅₀) protected and reversed the oxidative damage produced in the DNA by H₂O₂ and Ro19-8022 in HepG2 and Caco-2 cells.

The results obtained in these assays are compiled in the following publication:

- **MUTAGENIC AND GENOTOXIC POTENTIAL ASSESSMENT OF A PURE STILBENE EXTRACT BY IN VITRO STUDIES** (*Medrano-Padial et al., 2021. Food and Chemical toxicology (under revision)*).

The EFSA recommendations indicate that contradictory results in the *in vitro* genotoxic evaluation have to be confirmed in *in vivo* studies. For this reason, a study combining the MN test in bone marrow and the comet assay in liver, stomach and blood, standar and combined with FPG and Endonuclease III (Endo-III) was performed. The results obtained indicate that the extract ST-99 did not produce any breakage or oxidation of the DNA. Moreover, the ratio between polychromatic and normochromatic erythrocytes and the number of MN in polychromatic erythrocytes were similar in control rats and those treated with ST-99, indicating that our extract did not cause damage in the bone marrow. Furthermore, to complete these results, a histopathological study of liver and stomach was carried out, showing that only at the highest concentration tested, which is 100 times higher than the dose that would reach the consumer (360 µg/mL), slight damage was detected. In addition, according to OECD recommendations, the absence of toxicity must be corroborated with some method that confirms that the target tissues have been exposed to the studied substance (OECD 474 and OECD 489). For this reason, an ultra-high pressure liquid chromatography coupled to a mass spectrometer (UPLC-HESI-MS) was performed as a technique to demonstrate the presence of stilbenes and their derivatives in biological samples. The results obtained confirmed the presence of *trans-ε*-viniferin and *trans*-resveratrol in blood and liver. These data are collected in the following publication:

- **IN VIVO GENOTOXICITY OF STILBENE EXTRACT INTENDED TO BE USED AS NATURAL ADDITIVE: A COMBINATION OF THE MICRONUCLEUS TEST AND THE COMET ASSAY** (*provisional title*).

II. INTRODUCCIÓN
INTRODUCTION

1. IMPORTANCIA DEL SECTOR VITIVINÍCOLA.

El sector vitivinícola es una parte importante, no sólo de la economía, sino también de la sociedad y cultura, tanto en España como en Europa. Datos aportados por la Organización Mundial del Viña y el Vino (OIV) sobre la situación global de la industria vitivinícola de 2019, estiman el tamaño del viñedo mundial (indistintamente del destino final de las uvas e incluidos los viñedos que todavía no están en producción) en 7.4 millones de hectáreas, de los que 3.2 millones de hectáreas se encuentran en la Unión Europea (OIV, 2020) (Figura 1).

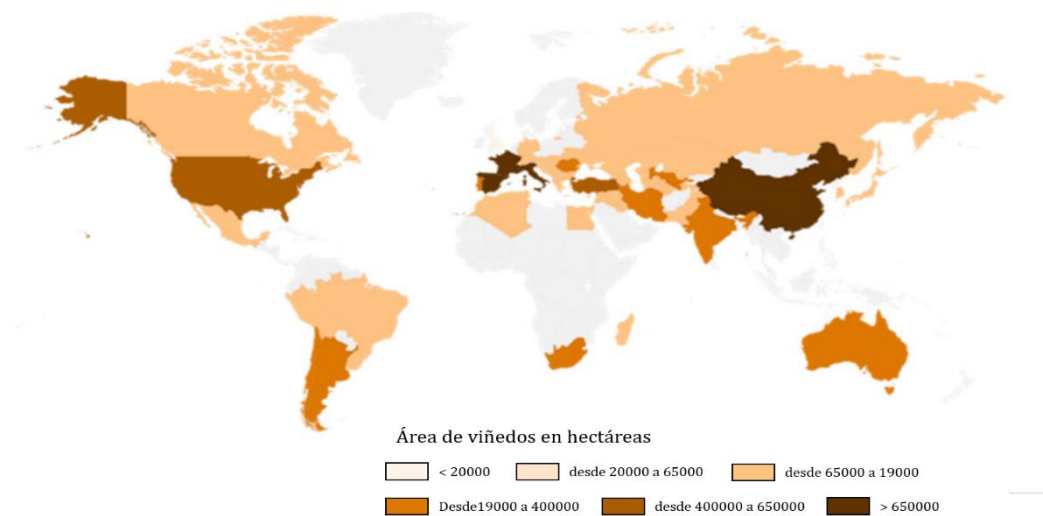


Figura 1. Distribución territorial de la superficie de viñedo (Fuente: OIV).

España es el país con mayor superficie vitícola (13%), seguido de China (12%), Francia (11%), Italia (9%) y Turquía (6%) (OIV, 2019) (Figura 2).

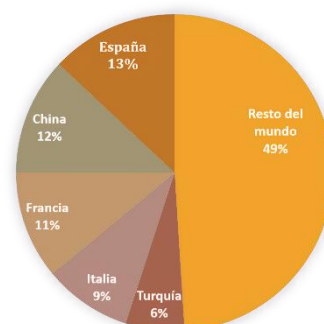


Figura 2. Países con mayor superficie vitícola (Fuente: OIV).

El valor mundial de las exportaciones de vino sigue una tendencia al alza sostenida que comenzó en 2010 y alcanza un nuevo pico récord en 2019, con un valor de 31.800 millones de euros. Asimismo, el comercio internacional del vino en términos de volumen, que asciende a 105.8 millones de hectolitros, ha estado principalmente dominado por tres países europeos, Italia, España y Francia, que juntos exportaron el 54% del mercado mundial (OIV, 2020).

Por comunidades autónomas en España, Castilla La Mancha posee la mayor superficie de viñedo, seguido de Extremadura, Castilla y León y la Comunidad Valenciana (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2019). Por otro lado, cabe destacar que, durante el año 2019, España ha sido el primer exportador mundial de vino en volumen, con algo más de 21 millones de hectolitros, y el tercer mayor exportador del mundo en valor, con cerca de 2.700 millones de euros exportados en 2018 (OIV, 2019; OIV, 2020). En cuanto a la facturación total de las bodegas españolas, esta asciende a 6.500 millones de euros al año y el conjunto del sector representa alrededor del 1% del Producto Interior Bruto (PIB) nacional (Federación Española del vino, 2020).

La importancia del sector vitivinícola a todos los niveles sociales, económicos, gastronómicos, medioambientales, culturales e históricos es indiscutible tanto por su impacto nacional como por nuestro liderazgo a nivel internacional.

Los avances tecnológicos y la innovación están muy presentes en el sector del vino en España. En el último lustro se ha invertido de media un importe de entre 170 y 180 millones de euros/año, lo que supone aproximadamente el 12-13% del gasto I+D del sector alimentación y bebidas y el 1,3% del gasto total en I+D+i en España (Plataforma Tecnológica del Vino, 2017). Gracias a ello, España es, actualmente, líder en investigación científica sobre vino en el mundo, siendo el país con mayor número de publicaciones científicas relacionadas con el vino por delante de Estados Unidos, Italia, Francia y China (Jamali y cols., 2020). Además, destacamos por ser colaboradores internacionales con países latinoamericanos al igual que con Francia e Italia (Jamali y cols., 2020).

2. APLICACIONES DEL SULFUROSO EN EL VINO. CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES.

El anhídrido sulfuroso o sulfuroso (SO₂) (Figura 3) ha sido utilizado como conservante desde finales del siglo XVIII. Hoy en día se usa en la industria alimentaria, especialmente en alimentos de pH bajo, como zumos de frutas y bebidas fermentadas (Guerrero y Cantos-Villar, 2015).

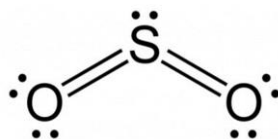


Figura 3. Estructura molecular del SO_2 .

En enología, se trata de uno de los aditivos más versátiles y eficientes debido a sus propiedades antimicrobianas, antioxidantes y por minimizar la velocidad de polimerización de los fenoles y, en consecuencia, la pérdida de color durante el envejecimiento del vino (Tabla 1) (Raposo y cols., 2018).

Se utiliza en tres etapas del proceso de vinificación (Lustrato y cols., 2003; Sonni y col., 2011):

- En la etapa pre-fermentativa, para prevenir la oxidación del mosto e inhibir el crecimiento bacteriano.
- Tras los procesos de fermentación, previamente a la etapa de crianza o conservación, con el objetivo de inhibir las bacterias.
- Antes del embotellado, para estabilizar los vinos.

Normalmente, se añade a los mostos una concentración aproximada de 80 mg/L de SO_2 para vinos blancos y 50 mg/L para vinos tintos.

En disolución, existe un equilibrio entre el SO_2 molecular y los iones bisulfito (HSO_3^-) y sulfito (SO_3^{2-}) (Figura 4). Estos compuestos son los denominados sulfitos. La forma molecular SO_2 es fundamental, ya que es la única fracción que posee las propiedades antimicrobianas y antioxidantes, siendo de 100 a 500 veces más activo que el ion bisulfito (Divol y cols., 2012).

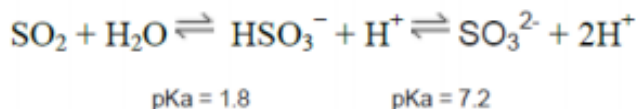


Figura 4. Equilibrio químico entre SO_2 , HSO_3^- y SO_3^{2-} .

La concentración de estas distintas formas depende del pH del vino y en menor medida de la temperatura. En general, el pH de los vinos se encuentra entre 3 y 4, siendo la especie predominante el HSO_3^- , por ello, el SO_2 se añade después de la acidificación del mosto o vino disminuyendo así el pH y favoreciendo la formación de la forma activa (Divol y cols., 2012).

Por lo tanto, las actividades antioxidantes y antimicrobiana del SO₂ dependerán de la dosis añadida, pero también de su grado de combinación y de la proporción de SO₂ molecular, bisulfito y sulfito presentes en el vino (Zamora, 2005).

A continuación, se muestra una tabla resumen con las propiedades, ventajas y desventajas del uso del SO₂ en vinos (Tabla 1).

PROPIEDADES	VENTAJAS	DESVENTAJAS	REFERENCIAS
ANTIOXIDANTE	<ul style="list-style-type: none"> -Previene la oxidación de hidroxicinamatos. -Inactiva enzimas oxidantes (polifenoloxidasas, peroxidasa, tirosinasa y proteasas). -Inhibe las reacciones de Maillard. -Captador de oxígeno. -Reduce el H₂O₂. -Reacciona con las quinonas y las semi-quinonas. 	-Su efectividad depende del pH.	Oliveira y cols., 2011; Pati y cols., 2014; Hamzaoglu y cols., 2018; Li y cols., 2008; Danilewicz, 2007; Panero y cols., 2015; Ribereau-Gayon y cols., 2006.
ANTIMICROBIANO	<ul style="list-style-type: none"> -Inhibe el crecimiento de las bacterias y levaduras. -Previene fermentaciones secundarias de levaduras. -Evita la formación de aminas biogénicas, etilfenoles y olores desagradables. -Las levaduras como <i>Saccharomyces</i> muestran una cierta tolerancia (responsables de transformar el mosto en vino). 	<ul style="list-style-type: none"> -Su efectividad depende del pH. -30 a 50 mg/L de SO₂ libre puede ser ineficaz contra algunos microorganismos (bacterias acéticas). 	Zironi y cols., 2009; Divol y cols., 2012; Mendoza y cols., 2018; Edwards y Oswald., 2017; Quirós y cols., 2012.
PODER DE EXTRACCIÓN	-Mejora la extracción de antocianos, polifenoles minerales y compuestos orgánicos.	<ul style="list-style-type: none"> -Sólo se da durante un breve periodo de tiempo. -Produce una ligera pérdida del color del vino debido a aductos con los antocianos que son incoloros. 	Ribereau-Gayon y cols., 2006; Zironi y cols., 2009.
SENSORIALES	<ul style="list-style-type: none"> -Reducción de la velocidad de polimerización fenólica y por lo tanto de pérdida de color y sabor. -Mejora el aroma del vino en caso de vendimias con estado sanitario deficiente o variedades neutras. 	<ul style="list-style-type: none"> -Da lugar a alteraciones organolépticas: formación de H₂S y mercaptanos. -A muy altas concentraciones de SO₂, se producen sabores y aromas desagradables. 	Jackowetz y Mira de Orduña, 2013; OIV, 2019b; Li y cols., 2008; Guerrero y Cantos-Villar, 2014.

Tabla 1. Ventajas y desventajas del SO₂
(adaptado de Guerrero y Cantos-Villar, 2015).

2.1. EFECTOS SOBRE LA SALUD.

En la última década, el uso de SO₂ en la industria alimentaria se ha asociado con algunos riesgos para la salud de los consumidores (Vally y cols., 2009).

Se estima que cerca de un 1 % de la población presenta una sensibilidad elevada a los sulfitos debido a un déficit de la enzima sulfito-oxidasa que afecta al metabolismo de sulfitos. Después de una ingesta de 0.25–2 mg/L de este aditivo, estos consumidores pueden sufrir dolores de cabeza, dificultades respiratorias, diarrea, reacciones alérgicas, fatiga, irritación, hinchazón de cara, labio y/o garganta (Lisanti y cols., 2019; Vally y Thompson, 2003). Es por ello, que en el caso de vinos con concentraciones de SO₂ mayores a ésta, se debe indicar la presencia de sulfitos en la etiqueta.

Por otro lado, entre un 5-10% de los adultos asmáticos con tratamiento esteroide o que tienen un alto grado de hiperreactividad en las vías respiratorias, también pueden sufrir reacciones alérgicas que podrían ser severas, ya que los derivados del SO₂ pueden causar la activación de proto-oncogenes, la inactivación de genes supresores de tumores, y desempeñar un papel en la patogénesis del cáncer de pulmón (Qin y Meng, 2009; Lisanti y cols., 2019).

Además, el SO₂ y sus derivados han sido clasificados como tóxicos sistémicos, ya que inducen un aumento en las frecuencias de aberraciones cromosómicas, intercambios de cromátidas hermanas y micronúcleos en células de mamíferos, y también causan daño oxidativo en múltiples órganos de ratones (Lisanti y cols., 2019).

Otro aspecto que considerar es la pérdida del valor nutricional de algunos alimentos debido a la capacidad que tienen los sulfitos para descomponer la tiamina o vitamina B1 en tiazol y pirimidina. Por este motivo el uso de sulfitos debe permanecer restringido al mínimo nivel necesario tecnológicamente, sobre todo en alimentos ricos en tiamina como la carne (Lisanti y cols., 2019; Malik y Sibra, 2005; Werner y cols., 2005).

Sobre la base de tales evidencias, existe la necesidad de reducir la cantidad de SO₂ utilizada, ya que este compuesto no sólo se encuentra en el vino y la cantidad consumida es acumulativa en el organismo.

En España, el uso del SO₂ y los sulfitos se permite en determinadas condiciones y amplia variedad de alimentos (RD 1118/2007), por ejemplo, en galletas, siropes, patatas, cervezas, productos vegetales frescos, frutos secos, crustáceos y algunas carnes. Las dosis máximas permitidas dependen del alimento y comprenden un amplio rango de concentración, que oscila entre los 10 y los 2000 mg/kg de SO₂.

Por todo lo expuesto anteriormente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó una ingesta diaria máxima aceptable (IDA) de 0,7 mg de SO₂ por kg de peso corporal (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN), 2016). Sin embargo, en 2016, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) concluyó que la exposición del consumidor a sulfitos está por encima de la IDA en todos los grupos de población, siendo las mayores exposiciones en niños pequeños (12-35 meses) y en niños (3-9 años). A la vista de estos resultados, la exposición es elevada y requiere establecer medidas de gestión del riesgo que den lugar a una reducción importante en el uso del SO₂ (AECOSAN, 2016; EFSA, 2016).

2.2. ALTERNATIVAS A SU USO EN ENOLOGÍA.

El consumidor demanda cada vez más alimentos con alto valor nutricional, microbiológicamente seguros y lo más “naturales” (sin aditivos químicos) posibles.

Por otro lado, debido a los problemas que supone su uso y a las recomendaciones de las distintas organizaciones internacionales, desde hace casi 10 años ha habido un incremento en los estudios enfocados en la disminución de las concentraciones de SO₂ en el vino. En este sentido, actualmente existen algunos vinos comercializados con bajos contenidos en sulfitos conseguidos mediante un meticuloso cuidado de la producción desde la viña a la botella, realizando una producción de uva sana, fermentaciones muy cuidadas y postfermentaciones con un buen manejo de gases inertes. Sin embargo, este proceso es muy complicado, por lo que se están valorando otras alternativas, totales o parciales al SO₂, las cuales se pueden clasificar en métodos físicos y químicos y veremos a continuación (Tablas 2 y 3).

2.2.1. *Tratamientos físicos.*

La principal ventaja de usar métodos físicos para garantizar la estabilidad microbiológica del vino y evitar oxidaciones, es la no adición de sustancias químicas que puedan afectar a la salud del consumidor y la calidad del vino.

La eliminación del SO₂ mediante procesos físicos viene reflejada en las prácticas enológicas autorizadas por el UE 2019/934 de la comisión del 12 de marzo de 2019, especificándose que únicamente se llevaran a cabo en la uva fresca, el mosto de uva, el mosto de uva parcialmente fermentado, el mosto de uva parcialmente fermentado procedente de uva pasificada, el mosto de uva concentrado, el mosto de uva concentrado rectificado o el vino nuevo aún en proceso de fermentación (UE 2019/934).

Los métodos físicos se pueden dividir a su vez en tratamientos térmicos y no térmicos (Tabla 2).

Los tratamientos térmicos como la pasteurización, la esterilización o la congelación son efectivos para inactivar microorganismos y la actividad enzimática oxidante y, por lo tanto, son utilizados comúnmente en la industria alimentaria (Li y cols., 2017; Ortega-Heras y cols., 2012; Yildirim y Darici, 2020). Además, permiten la extracción de compuestos fenólicos, enriqueciendo la composición de los vinos (Bakker y Clarke, 2011; Corrales y cols., 2009; El Darra y cols., 2013; Peinado y cols., 2004; Ševcech y cols., 2015).

Sin embargo, la aplicación de temperaturas excesiva para lograr la letalidad contra patógenos específicos puede degradar polifenoles y otros compuestos bioactivos del vino, viéndose mermada la calidad y los atributos sensoriales de estos (Bornšek y cols., 2015; Li y cols., 2014; Rodríguez y cols., 2016; Ševcech y cols., 2015; Wu, y cols., 2014).

Los tratamientos no térmicos, en contraste con los procesos térmicos, no causan importantes cambios en el color, olor, sabor y calidad del vino. Los procesos más destacados son la alta presión hidrostática, pulsos eléctricos, ultrasonidos y la radiación ultravioleta. Las características, ventajas y desventajas de estos métodos están citados en la tabla 2.

Sin embargo, hasta el momento ninguno de estos métodos físicos ha demostrado poder sustituir completamente al SO₂, aunque un reemplazo parcial sí es posible mediante la combinación de tratamientos (Guerrero y Cantos-Villar, 2015).

2.2.2. *Tratamientos químicos.*

Se han identificado muchos conservantes químicos para reducir el nivel de SO₂ que se utiliza en la producción de vino (Tabla 3). Recientemente, se ha sugerido que el uso de compuestos químicos como el dicarbonato de dimetilo, complejos de plata, lisozima, bacteriocinas, quitosano, glutatión pueden prevenir la oxidación del vino e inhibir los microorganismos no deseados (Amato y cols., 2017).

Por otro lado, debido a que actualmente tanto en España como a nivel global se impone una tendencia favorable hacia alimentos que contengan aditivos naturales, el uso de polifenoles como los estilbenos, ácido cafeico, catequinas o taninos se presenta como una interesante alternativa al SO₂ (Amato y cols., 2017).

Otro posible método es la utilización de extractos de origen natural. Ya se han propuesto extractos fenólicos como conservantes en la industria alimentaria. Entre ellos, los taninos enológicos (Sonni y cols., 2009), extractos vegetales (Salaha y cols., 2008) y extractos de piel de almendras o de eucalipto (González-Rompinelli y cols., 2013) han

resultado eficientes en la reducción de SO₂ en los vinos. Los vinos tratados con estos extractos naturales serán más competitivos en el mercado global actual, y por ello, se necesitan estudios actuales sobre los efectos de los extractos de plantas sobre la calidad, las propiedades sensoriales del producto final y la seguridad de los consumidores (Raposo y cols., 2016a; Yildirim y Darici, 2020).

ALTERNATIVAS	VENTAJAS	DESVENTAJAS	REFERENCIAS
TRATAMIENTOS TÉRMICOS.			
APLICACIÓN DE CALOR / CONGELACIÓN.	<ul style="list-style-type: none"> - Antimicrobiano. - Reduce la actividad enzimática oxidante. - Extracción de compuestos fenólicos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Degradación de algunos compuestos bioactivos del vino. - Modifica características sensoriales. 	Li y cols., 2014; Lambri y cols., 2015; Može Bornšek y cols., 2015; Rodríguez y cols., 2016; Ševcech y cols., 2015; Yildirim y Darici, 2020
TRATAMIENTOS NO TÉRMICOS.			
ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA.	<ul style="list-style-type: none"> - Antimicrobiano. - Reduce la actividad enzimática oxidante. 	<ul style="list-style-type: none"> - Degradación de algunos compuestos bioactivos del vino. - Modifica características sensoriales. - Infraestructura compleja y costosa. 	Briones-Labarca y cols., 2017; Santos y cols. 2013, 2016; Tao y cols., 2012.
PULSOS ELÉCTRICOS.	<ul style="list-style-type: none"> - Antimicrobiano. - Extracción de compuestos fenólicos. - Cortos tiempos de procesamiento. 	<ul style="list-style-type: none"> - Degradación de algunos compuestos bioactivos del vino. - Modifica características sensoriales. - Infraestructura compleja y costosa. - Corrosión de los materiales de los electrodos de metal. - La eficacia depende de la intensidad del campo eléctrico, el tiempo de tratamiento y de almacenamiento, y la variedad de uva. 	Abca y Evrendilek 2015; González-Arenzana y cols., 2019 a, b; López y cols., 2009; López-Giral y cols., 2015; Yang y cols., 2016.
ULTRASONIDOS.	<ul style="list-style-type: none"> - Antimicrobiano. - Extracción de compuestos fenólicos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Infraestructura compleja y costosa. - La eficacia depende del tipo y número de bacterias. - Faltan ensayos a gran escala. 	Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas, 2012; Gracin y cols., 2016; Luo y cols., 2012.
LUZ ULTRAVIOLETA.	<ul style="list-style-type: none"> - Antimicrobiano. - Evita el deterioro del vino a la misma velocidad que el SO₂. 	<ul style="list-style-type: none"> - Elevado tiempo de exposición. - Poco volumen. - Modifica características sensoriales. - Menos efectivo en vinos blancos. - La eficacia depende de la apariencia y las características del producto (color, densidad, materia en suspensión...). 	Falguera y cols., 2011; Fredericks y Krügel 2011; Rizzotti y cols., 2015
BAJA CORRIENTE ELÉCTRICA.	<ul style="list-style-type: none"> - Antimicrobiano. 	<ul style="list-style-type: none"> - Elevado tiempo de exposición. - Pocos estudios. 	Lustrato y cols., 2006; 2010

Tabla 2. Ventajas y desventajas de los tratamientos físicos como alternativas al SO₂.

ALTERNATIVAS	VENTAJAS	DESVENTAJAS	REFERENCIAS
DICARBONATO DE DIMETILO.	<ul style="list-style-type: none"> - Antimicrobiano. - Reduce actividad enzimática oxidante. 	<ul style="list-style-type: none"> - Menos efectivo en bacterias que en levaduras. - Su eficacia depende de temperatura, pH y de la especie, cepa y concentración de microorganismos. - Modifica características sensoriales. 	Ancín-Azpilicueta y cols. 2016; Nieto-Rojo y cols., 2015; Santos y cols., 2012.
COMPLEJOS DE PLATA.	<ul style="list-style-type: none"> - Antimicrobiano. 	<ul style="list-style-type: none"> - Modifica características sensoriales, especialmente en vinos blancos. - Las nanopartículas de plata presentan citotoxicidad. 	García-Ruiz y cols., 2015; Garde-Cerdán y cols., 2014; Gil-Sanchez y cols., 2019. Izquierdo-Cañas y cols., 2012
LISOZIMAS.	<ul style="list-style-type: none"> - Antimicrobiano. - Control fermentación maloláctica. 	<ul style="list-style-type: none"> - La eficacia depende de la especie bacteriana y condiciones de vinificación. - Efecto limitado - Modifica características sensoriales. - Reacciones alérgicas. 	Carstens y col., 2014; Chen y cols., 2015; Liburdi y cols., 2014; Mainente y cols., 2017; Santos y cols., 2012; Sonni y cols., 2011.
BACTERIOCINAS.	<ul style="list-style-type: none"> - Antimicrobiano (muy específico). - Control fermentación maloláctica. 	<ul style="list-style-type: none"> - Modifica características sensoriales. - No presentan capacidad antioxidante. 	Díez y cols., 2012; Fernández-Pérez y cols. 2018; García-Ruiz y cols., 2013;
QUITOSANO.	<ul style="list-style-type: none"> - Antimicrobiano. - Antioxidante. 	<ul style="list-style-type: none"> - La actividad antioxidante no se mantiene en el tiempo. - Sólo se solubiliza en medio ácido. - Alta viscosidad. - Afecta a las proteínas. 	Nunes y cols., 2016; Petrova y cols., 2016; Ramos-De la Peña y cols., 2014; Valera y cols., 2017.
GLUTATION.	<ul style="list-style-type: none"> - Antioxidante. - Efecto protector. - La combinación con otros antioxidantes es efectiva. 	<ul style="list-style-type: none"> - Modifica la concentración de fenoles, catequinas, epicatequinas, ácidos cafeico y cumarico, y en especial de las antocianinas. 	Fracassetti y cols., 2016; Ferrer-Gallego y cols., 2017; Gambuti y cols. 2015, 2017; Panero y cols. 2015; Webber y cols., 2017.
EXTRACTOS FENÓLICOS DE SUBPRODUCTOS DE LA UVA.	<ul style="list-style-type: none"> - Antimicrobiano. - Antioxidante. - Extracción de compuestos fenólicos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Modifica características sensoriales. - Las actividades antimicrobianas y antioxidantes de los fenoles dependen de su estructura química y el número y posición de sus grupos hidroxilos. 	Alañón y cols., 2015; Cheynier, 2012; Galuska y Makris, 2013; Harbertson y cols., 2012; Silva y cols., 2018.
EXTRACTOS DE MADERA DE ROBLE.	<ul style="list-style-type: none"> - Antimicrobiano. - Antioxidante. - Mejora color. - Aumento de taninos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Modifica características sensoriales. - Pocos estudios en vinos. 	Pascual y cols., 2017; Rubio-Bretón y cols., 2018; Ricci y cols., 2016; Versari y cols., 2013.
EXTRACTOS DE ACEITUNA.	<ul style="list-style-type: none"> - Antimicrobiano. - Antioxidante. - Mejora color, olores y sabores. 	<ul style="list-style-type: none"> - La actividad antioxidante no se mantiene en el tiempo. - Modifica características sensoriales. 	Anand y Sati, 2013; Raposo y cols. 2016b, 2016c; Serra y cols., 2008.
OTROS EXTRACTOS DE PLANTAS.	<ul style="list-style-type: none"> - Antimicrobiano. - Antioxidante. - Su combinación puede ser sinérgica. 	<ul style="list-style-type: none"> - Pocos estudios en vinos. - Modifica características sensoriales. 	González-Rompinelli y cols., 2013; Malayoğlu, 2010

Tabla 3. Ventajas y desventajas de los tratamientos químicos como alternativas al SO₂.

3. CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES DE LOS ESTILBENOS.

En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Estos compuestos son denominados polifenoles y son sintetizados por plantas como productos de su metabolismo secundario en respuesta a condiciones de estrés como polución, radiaciones ultravioletas, temperaturas extremas y parásitos, entre otras (Ganesan y Xu, 2017). En función del número de anillos fenólicos que posean y de los elementos estructurales que presenten, existen diferentes clases y subclases de polifenoles: ácidos fenólicos derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico, estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Cutrim y Cortez, 2018; Galiniak y cols., 2019; Ganesan y Xu, 2017). En la presente tesis, nos centraremos en los estilbenos.

La palabra estilbeno proviene del griego stilbos, que significa “brillante” debido a que estos compuestos emiten fluorescencia de color azul cuando son expuestos a luz ultravioleta (Likhtenshtein, 2012). Se tratan de polifenoles no flavonoides químicamente constituidos por dos anillos aromáticos enlazados por puentes etilo (1,2-difeniletileno) (Figura 5) obtenidos por la ruta mixta del ácido shikímico y del acetato (Khan y cols., 2017). Se pueden encontrar en uvas, vino, cacahuetes, arándanos, frambuesas, moras y chocolate, entre otros (Courtois y cols., 2017; Sirerol y cols., 2016).

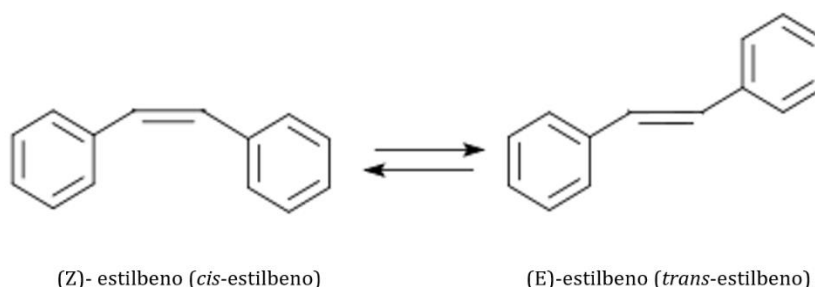


Figura 5. Estructura molecular de los estilbenos.

Los estilbenos a su vez se pueden clasificar en monoméricos y oligoméricos. Los denominados estilbenos oligoméricos presentan uniones entre estilbenos monoméricos homogéneos o heterogéneos, por lo que poseen gran variedad de estructuras. Además, existen dos formas isoméricas de los estilbenos: la (E)-estilbeno (*trans*-estilbeno) y la (Z)-estilbeno (*cis*-estilbeno), siendo la forma *trans* la más estable termodinámicamente y presentando, de forma general, mayor actividad que su isómero, probablemente debido impedimentos estéricos que la forma *cis* presenta (Figura 5) (Khan y cols., 2017; Likhtenshtein y cols., 2012).

En cuanto a su distribución en el reino vegetal, la familia *Leguminosae* contiene el mayor número estilbenos monoméricos, mientras que la *Dipterocarpaceae* es una rica fuente de oligoméricos (Shen y cols., 2009). La cantidad de estos compuestos en las plantas depende de la especie o variedad, expresión de la enzima estilbeno sintetasa, técnica y condiciones de cultivo, estado de maduración, así como condiciones de procesado (pelado, troceado, hervido y fritura) y almacenamiento, entre otras (Ortega y cols., 2015). Además, su distribución en los tejidos de plantas, a nivel celular y subcelular no es uniforme, encontrándose en mayor medida en capas exteriores, como hojas y piel (Ortega y cols., 2015).

Por otro lado, la biodisponibilidad de los estilbenos, como de la mayoría de los compuestos fenólicos, es bastante baja debido a múltiples factores como son la estructura química, el grado de glicosilación, la conjugación con otros fenoles, el tamaño molecular, la solubilidad o su rápida metabolización en diferentes órganos, entre otros (Del Rio y cols. 2013; Sirerol y cols., 2016). Por esta razón, la biodisponibilidad puede diferir significativamente entre los muchos compuestos fenólicos diferentes, aunque estén estrechamente relacionados. Por todo ello, y por otras razones como el tipo de dieta y la dificultad del análisis cualitativo y cuantitativo de estos compuestos, la información sobre la ingesta total de estilbenos es escasa (El Khawand y cols., 2018).

Actualmente estos compuestos se utilizan ampliamente en la fabricación de tintes industriales, tintes láser, blanqueadores ópticos, fósforos, centelladores y otros materiales. Sin embargo, en los últimos años, los estilbenos y sus análogos han adquirido una enorme importancia debido a su diverso espectro de aplicaciones biológicas como anticancerígeno, antiproliferativo, antiangiogénico, bactericida, bacteriostático, antifúngico, antileucémico, antioxidante, antiinflamatorio, vasodilatador, entre otros (Khan y cols., 2017). Además, numerosos estudios indican un efecto positivo de estos compuestos frente a diversas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como las cardiovasculares, diversos tipos de cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Sirerol y cols., 2016), debido sobre todo a sus interacciones con diversas dianas moleculares como factores de transcripción, citoquinas, aromatasas y ciclooxigenasas (Sirerol y cols., 2016).

A continuación, hablaremos de los dos estilbenos en los que se centra nuestro estudio.

3.1. *TRANS*-RESVERATROL.

El *trans*-resveratrol (3,5,4'-*trans*-trihidroxiestilbeno) (Figura 6) es el estilbeno más abundante en la naturaleza, y por ello el más estudiado. Fue aislado por primera vez de las raíces del heléboro (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) en 1940 (Takaoka, 1940), y después, en 1963, de las raíces de *Polygonum cuspidatum* (Nonomura y cols., 1963). Se encuentra presente en altas concentraciones en una amplia variedad de plantas y frutos, incluyendo cacahuetes, arándanos, pinos y plantas utilizadas en la medicina oriental (Burns y cols., 2002; Rimando y cols., 2004). Además, está presente de forma importante en la piel y semillas de la uva por lo que en muchos casos se aísla de extractos de *Vitis Vinifera*.

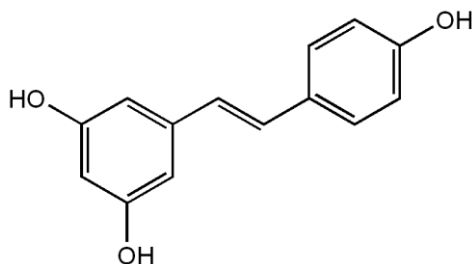


Figura 8. Estructura molecular del *trans*-resveratrol.

Este estilbeno presenta una baja solubilidad en agua afectando en gran medida a su absorción (Kuršvietienė y cols., 2016). Además, en animales y seres humanos, el resveratrol es metabolizado rápidamente dando lugar a sulfatos y glucurónidos conjugados por lo que la biodisponibilidad de este compuesto es limitada (Kuršvietienė y cols., 2016).

En los últimos años este compuesto está cobrando especial relevancia. Muchos estudios han demostrado que el *trans*-resveratrol debido a su potente actividad antioxidante (Galiniak y cols., 2019) presenta un importante papel en la prevención de diversas patologías asociadas al estrés oxidativo, como el cáncer (Rodríguez-García y cols., 2019), enfermedades cardiovasculares (Huo y cols., 2019), autoinmunes (Khan y cols., 2017), infecciosas (Li y cols., 2019) y en el envejecimiento (Silva y cols., 2019).

Por otro lado, varios autores indican que el resveratrol prolonga la vida media de algunos organismos, desde levaduras (Howitz y cols., 2003), moscas (Wang y cols., 2013) y abejas (Rascon y cols., 2012) hasta peces (Liu y cols., 2015; Valenzano y cols., 2006) y ratones (Baur y cols., 2006) previniendo la neurodegeneración. En este sentido, este compuesto también participa en la reducción del daño neuronal producido en el alzheimer (Freyssin y cols., 2020; Li y cols., 2018), parkinson y en la enfermedad de Huntington (Sarubbo y cols., 2020) ya que disminuye el daño oxidativo y la inflamación crónica, mejora la función vascular y activa genes de longevidad (Rauf y cols., 2017). Además, el *trans*-

resveratrol también ha demostrado mejorar el deterioro cognitivo asociado con la diabetes y revierte los cambios en la expresión proteínica inducidos en esta patología (Rauf y cols., 2017).

Esta multiplicidad de efectos biológicos del resveratrol es debida principalmente por la abundancia y diversidad de dianas moleculares de este compuesto como ciclooxigenasas / lipooxigenasas, una amplia gama de diversas quinasas, sirtuinas, factores de transcripción, citocinas, ADN polimerasa, adenilil ciclasa, ribonucleótido reductasa y aromatasas (Galiniak y cols., 2019; Rauf y cols., 2017).

Actualmente existen muchos preparados que contienen resveratrol, comercializados en todo el mundo. En 2016, el *trans*-resveratrol fue aprobado por la Comisión Europea (UE 2016/1190) como nuevo ingrediente alimentario para ser utilizado en complementos alimenticios en forma de comprimidos o cápsulas destinados únicamente a la población adulta, con una dosis máxima de 150 mg. Por otro lado, existen diversos estudios sobre otras posibles aplicaciones como aditivo y conservante tanto en alimentación como en cosmética para mantener la calidad de los productos y ampliar su vida útil.

3.2. *TRANS-ε-VINIFERINA.*

La *trans-ε*-viniferina se trata de un dímero del resveratrol (Figura 7) presente en uvas y vinos, que ha sido mucho menos estudiado que otros estilbenos (Yáñez y cols., 2006; Caillaud y cols., 2019).

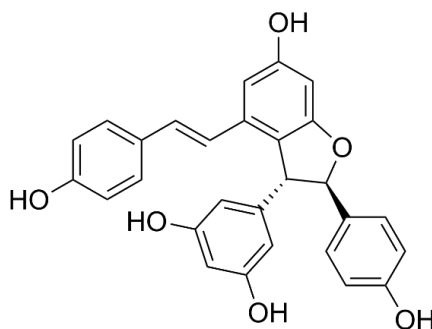


Figura 7. Estructura molecular de la *trans-ε*-viniferina

Se conoce que la *trans-ε*-viniferina posee actividades antioxidantes, antiinflamatorias, anticarcinogénicas y cardioprotectoras (Courtois y cols., 2017). Es capaz de modular la actividad del citocromo P450 y de provocar la apoptosis y modificaciones en el ciclo celular en células leucémicas induciendo la óxido nítrico sintetasa, incluso de manera más potente que el *trans*-resveratrol (Billard y cols., 2002; Giovannelli y cols., 2014;

Quiney y cols., 2004; Wu y cols., 2020). Además, en ratones ha demostrado poseer un efecto hepatoprotector y en ratas actúa como un antidepresivo inhibiendo la captación de noradrenalina y 5-hidroxitriptamina (Privat y cols., 2002; Wu y cols., 2020; Yáñez y cols., 2006).

Actualmente la ϵ -viniferina es utilizada en la industria de la cosmética, bien de manera individual o combinada con otros estilbenos o flavonoles, para el blanqueamiento de la piel y/o como anti-manchas en forma de crema, pomada, emulsión, liposoma, gel, loción o spray (Patente número ES2365168T3).

3.3. COMBINACIÓN DE ESTILBENOS.

La aparición de polifenoles de forma simultánea en la naturaleza es bastante común (Cutrim y Cortez, 2018). Sin embargo, a pesar de que los efectos de los estilbenos se han estudiado exhaustivamente de forma individual, hay muy pocos estudios que evalúen sus efectos combinados. Estos compuestos al tener diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción pueden dar lugar a fenómenos de interacción como la sinergia (potenciación o adición) o antagonismo (Balasubramani y cols., 2019). En este sentido, la EFSA recientemente ha publicado un informe sobre la importancia del estudio de los efectos de estas mezclas (EFSA, 2019).

El efecto de la combinación de fitoquímicos sobre la proliferación de células cancerígenas ha sido evaluado por varios autores (Balasubramani y cols., 2019; Castillo-Pichardo y Dharmawardhane, 2012; Iwuchukwu y cols., 2011; Tak y cols., 2011). En los últimos años, debido a que el resveratrol posee una serie de características de un agente quimiopreventivo ideal, como la falta de toxicidad en las concentraciones efectivas, el conocimiento de su mecanismo de acción, la aceptabilidad por parte del consumidor debido a que es un ingrediente dietético y su reducido coste, su mezcla con otros compuestos está cobrando interés con este fin (Singh y cols., 2013). Estos estudios llegan a la conclusión de que el resveratrol actúa mayoritariamente de manera sinérgica o aditiva con otros polifenoles, siendo sus efectos menores cuando actúan de manera individual (Balasubramani y cols., 2019; Castillo-Pichardo y Dharmawardhane, 2012; Iwuchukwu y cols., 2011; Tak y cols., 2011).

Por otro lado, la capacidad antioxidante de la combinación de polifenoles presentes en el vino también ha sido evaluada (Iwuchukwu y cols., 2011; Kurin y cols., 2012). Se ha demostrado la capacidad para eliminar radicales libres y modular la actividad de enzimas oxidantes de estos compuestos difiere notablemente cuando son estudiados por separado

y en sus mezclas. En presencia de otras sustancias se puede producir un efecto sinérgico, antagónico o aditivo que es difícil de deducir (Iwuchukwu y cols., 2011; Kurin y cols., 2012).

4. CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES DE EXTRACTOS NATURALES DE PLANTAS RICOS EN ESTILBENOS.

Los residuos de la industria vinícola han demostrado ser una fuente de compuestos fenólicos de diferentes clases, incluyendo los flavonoides (flavanoles, proantocianidinas, flavonas y flavonoles), los ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoico y hidroxicinámico) y los estilbenos. En los últimos años, existe un creciente interés en la revalorización de estos residuos como materias primas en la industria alimentaria (Lucera y cols., 2018; Maner y cols., 2017), cosmética (Manca y cols., 2016; Wittenauer y cols., 2015), ganadera (Guerra-Rivas y cols., 2016; Pascariu y cols., 2017), agrícola (Salgado y cols., 2019) o energética (Miranda y cols. 2011), ya que se estima que por cada 100 kg de uva procesada se generan unos 25 kg de subproductos, una importante cifra especialmente para países productores de vino, como España, Francia o Italia, en los que la producción puede alcanzar las 1.200 toneladas al año (Bordiga y cols., 2015).

Dado el alto contenido de polifenoles presentes en los subproductos, se han llevado a cabo numerosos estudios en la industria alimentaria relacionados con el alargamiento de la vida útil de diferentes productos. Se han utilizado extractos de orujo de uva para prevenir la oxidación lipídica en productos derivados del pescado (Pazos y cols., 2005) y por su capacidad antimicrobiana frente a diferentes bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli* O157: H7 y *Salmonella infantis* (Kataliníc y cols., 2010); así como frente a *Listeria monocytogenes* (Xu y cols., 2016). Así mismo se ha empleado la harina de orujo para dar consistencia y estabilidad frente a la oxidación lipídica en pescado congelado (Sánchez-Alonso y cols., 2007). Además de prevenir la lipooxidación y/o el crecimiento microbiano, los productos de la vinificación pueden evitar la formación de compuestos nocivos para la salud como demostraron Xu y cols. (2015). En su estudio empleó en un modelo de patatas fritas y un sistema fisiológico simulado en los que los extractos de semilla de uva redujeron la formación de acrilamida en un 90%.

En este sentido, los extractos de origen natural ricos en estilbenos generan un importante interés en la industria vitivinícola como sustitutos del SO₂ debido a sus interesantes propiedades antioxidantes, antimicrobianas y promotoras de la salud (Raposo y cols. 2018). Los brotes de vid con alto contenido en estos compuestos ya han sido probados en vinos, demostrando que éstos poseían mejores cualidades de color y

sensoriales que los tratados con SO₂. De manera similar, Cebrián-Tarancón y cols. (2019) estudiaron el efecto sobre los niveles de ácido elágico, *trans*-resveratrol, vainillina y guayacol del uso de brotes de vid en vinos después de 35 días de maceración, observando un aumento en ellos.

5. PROCESO DE AUTORIZACIÓN DE ESTILBENOS Y EXTRACTOS NATURALES COMO ADITIVO ALIMENTARIO.

Los aditivos son definidos como sustancias que, aunque no se consumen como alimentos por sí mismas, añadidos a éstos durante su fabricación cumplen una importante función tecnológica obteniéndose alimentos seguros y de calidad. Deben, por lo tanto, mantener la calidad nutricional del alimento, mejorar la estabilidad, ayudar a la conservación y propiedades de sabor, color y olor del alimento, pero sin confundir al consumidor, o ayudar en la fabricación, transformación, preparación, tratamiento, envasado y transporte del alimento (Reglamento (CE) N° 1333/2008).

Los aditivos han sido clasificados según su función en edulcorantes, colorantes, conservadores, antioxidantes, entre otros 26 tipos recogidos en el Anexo I del Reglamento (CE) N° 1333/2008. También se puede dividir en cuatro grupos fundamentales dependiendo de su origen y fabricación: aditivos naturales (obtenidos directamente de animales o plantas); similar a los aditivos naturales (producidos sintéticamente imitando los naturales); modificado de natural (aditivos naturales modificados químicamente); y finalmente, aditivos artificiales (compuestos sintéticos).

A la hora de autorizar nuevos aditivos alimentarios, se tienen en cuenta factores sociales, económicos, tradicionales, éticos y ambientales, aunque el factor clave siempre es la seguridad para el consumidor. Por ello, sólo se autorizan si cumplen los criterios establecidos en el Reglamento (CE) N° 1331/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, común para toda la Unión Europea.

El procedimiento cuenta con dos pilares fundamentales: una evaluación, llevada a cabo por la EFSA, y la gestión del riesgo, de lo que se encarga la Comisión Europea. Una vez que la EFSA ha emitido su dictamen en cuanto a la seguridad del aditivo, la Comisión estudia su posible autorización junto con otros expertos en aditivos alimentarios, como por ejemplo la AECOSAN.

Para que la EFSA pueda llevar a cabo la evaluación de un aditivo necesita:

- Datos sobre la identidad y caracterización del aditivo, tanto de sustancias individuales como de mezclas.
- Descripción del proceso de fabricación.
- Estabilidad del aditivo en los alimentos.
- Justificación de la necesidad y los usos propuestos.
- Autorizaciones ya existentes.
- Evaluación de la exposición prevista de la población al aditivo.
- Datos biológicos y toxicológicos en los que se centrará esta tesis doctoral. Este punto incluye datos sobre toxicocinética de la sustancia, su toxicidad crónica y subcrónica, su carcinogenicidad, su genotoxicidad, su toxicidad en la reproducción y el desarrollo de las personas y, en caso necesario, incluir otros estudios (Reglamento (CE) Nº 1331/2008).

En el año 2012, el panel de Aditivos Alimentarios y Fuentes de Nutrientes añadidos a los Alimentos de la EFSA publicó las directrices para la evaluación de la seguridad de los aditivos. Se trata de un enfoque escalonado basado en tres niveles (Figura 8). El primer paso es la realización de ensayos de absorción, genotoxicidad *in vitro* y estudios de toxicidad de 90 días. Estas pruebas nos permiten obtener datos básicos sobre el aditivo y, si se demuestra que se absorbe sistémicamente o se encuentran efectos genotóxicos, se deberán realizar las pruebas del segundo nivel. El nivel 2 generará datos más extensos sobre el metabolismo, genotoxicidad *in vivo*, toxicidad crónica, carcinogenicidad y toxicidad para la reproducción y el desarrollo del compuesto de estudio. En cuanto al tercer y último nivel, son ensayos muy específicos que tan sólo se realizarán cuando los resultados obtenidos en los otros niveles generen incertidumbre (EFSA, 2012).

Según estos datos, se determina el nivel por debajo del cual puede considerarse que el consumo de esta sustancia es seguro para la salud humana, la IDA, y se estiman los efectos si se sobrepasa. Además, se determinan niveles máximos de uso de los aditivos, teniendo en cuenta las poblaciones sensibles y la ingesta del aditivo a partir de otras fuentes distintas al alimento, así como la exposición al compuesto de determinados grupos de consumidores, como por ejemplo a los lactantes y niños de corta edad o a los consumidores alérgicos.

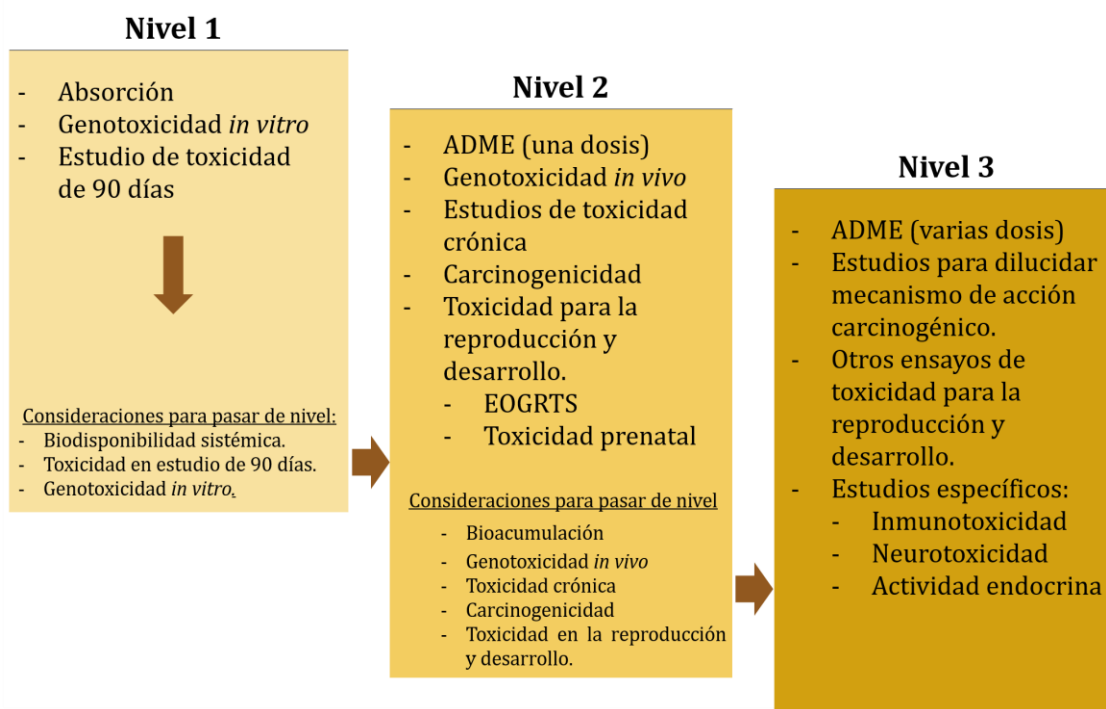


Figura 8. Pruebas de toxicidad por niveles para aditivos alimentarios. (Adaptado de EFSA, 2012).

Los aditivos autorizados y sus condiciones de uso en los productos alimenticios figuran el anexo II del Reglamento (CE) nº 1333/2008 sobre aditivos alimentarios, clasificándose en función de las categorías de alimentos a las que pueden añadirse y en las cantidades marcadas.

5.1. ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS NECESARIOS PARA COMERCIALIZAR ADITIVOS.

Los datos toxicológicos requeridos para el uso de los aditivos deben comprender información sobre la toxicocinética de la sustancia, genotoxicidad, toxicidad crónica, subcrónica, carcinogenicidad y toxicidad para la reproducción y el desarrollo de las personas y, en caso necesario, incluir otros estudios. De acuerdo con el enfoque escalonado propuesto por la EFSA, y como se muestra en la tabla 8, comenzaremos por el nivel 1.

Las pruebas toxicológicas se deben realizar de conformidad con una determinada norma. Para ello, deben seguirse las indicaciones de la Directiva 2004/10/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 11 de febrero de 2004, sobre la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas relativas a la aplicación de los principios de buenas prácticas de laboratorio y al control de su aplicación para las pruebas

sobre las sustancias químicas. Además, se deben llevar a cabo conforme a los «Principios de Buenas Prácticas de Laboratorio de la OCDE».

Como caso específico, de acuerdo con la guía sobre evaluación de la seguridad de productos botánicos y preparados botánicos destinados a ser utilizados como ingredientes en complementos alimenticios" de la EFSA, se podría aplicar una "presunción de seguridad" a los productos botánicos y preparados botánicos utilizados como aditivos alimentarios si los datos permiten concluir que la exposición a niveles conocidos del ingrediente botánico ha ocurrido en grandes grupos de población durante muchos años sin efectos adversos reportados (EFSA, 2009). Sin embargo, cuando se espera un aumento significativo en la ingesta o bien la composición química de los preparados botánicos no es igual a los utilizados históricamente, se debe llevar a cabo una valoración del riesgo (EFSA, 2009).

6. EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE ESTILBENOS Y EXTRACTOS NATURALES RICOS EN ESTILBENOS *IN VITRO*.

Los ensayos *in vitro* nos permiten contextualizar la situación de la sustancia de estudio y emitir una opinión acerca de la seguridad de su uso. Estos métodos son de gran interés debido a que son rápidos, se utilizan técnicas estandarizadas por lo que los resultados pueden ser reproducibles, posibilitan el uso de material de origen humano, tienen un bajo coste e instalaciones poco complejas, y, además nos sirven de base para establecer las dosis en futuros ensayos (Eisenbrand y cols., 2002).

6.1. TOXICOCINÉTICA.

La toxicocinética se define como el conjunto de fenómenos que experimenta el tóxico desde su entrada a un organismo hasta su eliminación. Se trata de una herramienta importante en la evaluación de riesgos para la salud humana que proporciona información valiosa para la selección de dosis y especies apropiadas para las pruebas de toxicidad.

Según la guía sobre la evaluación de los aditivos alimentarios, la evaluación toxicocinética debe seguir tres niveles. El primer nivel comprende los estudios de absorción y de metabolismo gastrointestinal *in vitro* del compuesto. En caso de resultados positivos, en el nivel 2 se definen la distribución, metabolismo y excreción y otros parámetros toxicocinéticos básicos como el área la curva, la vida media o la concentración máxima observados tras una sola dosis. Por último, para aquellos compuestos que pueden bioacumularse, en el tercer nivel se estudian los parámetros toxicocinéticos tras la administración de varias dosis (EFSA, 2012).

Los estilbenos, como la mayoría de los compuestos fenólicos, presentan una baja biodisponibilidad debido a múltiples factores como son la estructura química, el grado de

glicosilación, la conjugación con otros fenoles, el tamaño molecular, la solubilidad o su rápida metabolización en diferentes órganos, entre otros (Del Rio y cols., 2013; Sirerol y cols., 2016).

Los datos toxicocinéticos obtenidos *in vitro* del *trans*-resveratrol indican que este compuesto se biotransforma rápidamente a conjugados glucurónicos y sulfatos en células intestinales y de hepatocitos (Beck y cols., 2006).

En el caso de las mezclas botánicas ricas en estilbenos se debe de tener en cuenta la posibilidad de interacciones entre los componentes de la mezcla que puedan afectar a la biodisponibilidad, el metabolismo y la toxicidad y la posibilidad de interacciones con medicamentos (EFSA, 2009).

6.2. CITOTOXICIDAD BASAL Y ESTUDIOS MORFOLÓGICOS.

Los ensayos de citotoxicidad se llevan a cabo para valorar los efectos adversos o interferencias del objeto de estudio con estructuras y/o propiedades esenciales para la supervivencia, proliferación y función celular. A partir de estos estudios, es posible calcular la concentración efectiva media (EC_{50}), es decir, la concentración a la cual el 50 % de la población expuesta experimenta el efecto estudiado, en este caso la pérdida de viabilidad. La EC_{50} nos permite comparar los resultados obtenidos en diferentes líneas celulares y, además, definen el rango de concentraciones a evaluar en otros ensayos como genotoxicidad, inducción de mutaciones o mecanismos de muerte celular (Eisenbrand y cols., 2002; Gosslau, 2016).

Entre los diferentes métodos existentes para evaluar la viabilidad y la muerte celular, destacan la reducción del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) y sal de tetrazolio 3-[4,5, dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio (MTS) para evaluar la funcionalidad de las mitocondrias (Baltrop y cols., 1991), el ensayo de rojo neutro (RN) para conocer el daño en los lisosomas (Borenfreud y Puerner., 1984) y la valoración del contenido proteico total (PT) para medir la proliferación celular (Bradford, 1976).

A la hora de seleccionar las líneas celulares en las que llevar a cabo la evaluación, Gosslau (2016) propone desarrollar un pequeño screening en líneas celulares de interés y posteriormente desarrollar ensayos más específicos en líneas concretas que representen tejidos u órganos diana de ese efecto. En la presente tesis doctoral se eligieron líneas relacionadas con el aparato digestivo, puesto que la vía oral es la vía de exposición principal a los aditivos alimentarios.

El efecto citotóxico de los estilbenos ha sido ampliamente estudiado. El *trans*-resveratrol es citotóxico en gran variedad de células como la línea celular de carcinoma hepático HepG2 (Colin y cols., 2008; Mizuno y cols., 2017; Su y cols., 2013), la línea de adenocarcinoma de colon Caco-2 (Iwuchukwu y cols., 2011), en células de cáncer de mama MCF-7 (Thomas y cols., 2016), neuronales (Aggarwal y cols., 2004; Lantto y cols., 2009), en células de cuello de útero HeLa (Li y cols., 2018) o en células de cáncer de pulmón (Yousef y cols., 2017). Por otro lado, la ϵ -viniferin también ha demostrado tener efectos citotóxicos en diversos modelos celulares como las células de leucemia HL-60, las células de adenocarcinoma gástrico AGS (Tian y cols., 2019), células pulmonares (Sáez y cols., 2018) o las células orales humanas HGF, HPC y HPLF (Chowdhury y cols., 2015). Otros estilbenos que también destacan por su potente actividad citotóxica son el piceatanol y el pterostilbeno ya que se ha demostrado que son capaces de reducir la viabilidad celular incluso a bajas concentraciones de gran variedad de líneas celulares (Hu y cols., 2020; Liu y cols., 2013; Sáez y cols., 2018; Tolba y cols., 2015).

La citotoxicidad de los estilbenos se debe a una gran variedad de mecanismos entre los que se incluyen la detención del ciclo celular, la inducción de la apoptosis mediante la activación de la caspasa (Colin y cols., 2008), la modulación de la producción de óxido nítrico aumentando la expresión y actividad de la enzima óxido nítrico sintetasa (Notas y cols., 2006) o la regulación de factores de crecimiento (TNF o EGF) (Aggarwal y cols., 2004).

Por otro lado, ante una combinación de fitoquímicos que actúan a través de vías superpuestas o únicas es de esperar efectos sinérgicos, antagónicos o potenciadores sobre múltiples mecanismos que afectan al crecimiento celular y a la inducción de enzimas (Colin y cols., 2008; Iwuchukwu y cols., 2012). En concreto, se ha demostrado que el efecto citotóxico de las mezclas de estilbenos pueden ser más potentes que los obtenidos con los polifenoles de manera individual gracias a procesos de potenciación o sinérgicos entre los compuestos (Billard y cols., 2002; Colin y cols., 2008; Iwuchukwu y cols., 2012). Además, el contenido relativo de los diferentes estilbenos en estos extractos juega un importante papel relevante en su actividad antiproliferativa, asociándose negativamente con la relación *trans*-resveratrol/estilbenos totales, pero positivamente con la relación dímero/monómero (Giovannelli y cols., 2014).

Además de los estudios de citotoxicidad realizados en estilbenos, son útiles y necesarios los estudios morfológicos para determinar los daños ultraestructurales producidos en las células por estos compuestos y conocer su mecanismo de acción. Estos ensayos han demostrado ser más sensibles para detectar toxicidad en comparación con los de citotoxicidad (Llana Ruiz-Cabellos y cols., 2015). Los estudios de morfología llevados a cabo en modelos celulares expuestos a estilbenos han indicado que la reducción de la

viabilidad celular producida por ellos está asociada con la apoptosis. En este sentido, un estudio en la línea celular de mieloma múltiple U266 mostró que la ϵ -viniferina y el resveratrol inducen a la apoptosis afectando a la actividad de la caspasa e inhibiendo el potencial de membrana mitocondrial (Barjot y cols., 2007). Otro de los mecanismos implicados ha sido dilucidado en células colorrectales humanas SW480, donde la exposición de análogos del resveratrol dio lugar a una redistribución nuclear de ciclina A (Colin y cols., 2009). Esta afectación nuclear también se ha demostrado en células de cáncer de próstata expuestas a r-viniferina, un tetrámero del resveratrol (Empl y cols., 2015). Además, este efecto apoptótico también se observó en células de leucemia tras la exposición a resveratrol, ϵ -viniferina y dos extractos de origen natural, uno de ellos con un 10% de resveratrol y un 12% de ϵ -viniferina y otro con un 25% y 16% de resveratrol y ϵ -viniferina respectivamente (Billard y cols., 2002). Estos últimos autores indicaron además que los efectos obtenidos tras la exposición a los extractos fueron más pronunciados que con los compuestos individuales, probablemente debido a la interacción de todos los polifenoles presentes en la mezcla (Billard y cols., 2002).

6.3. ESTRÉS OXIDATIVO.

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de un sistema biológico de eliminar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante en ADN, proteínas y membranas lipídicas (Inglés y cols., 2014). Por lo tanto, aunque son muchos los mecanismos por los que una sustancia puede producir toxicidad, el estrés oxidativo y las alteraciones bioquímicas posteriores son de gran importancia.

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) promueven una situación de estrés, desencadenando mutaciones y favoreciendo procesos de carcinogénesis y dañando lípidos y proteínas desembocando en la muerte celular (Gosslau, 2016). La concentración de ERO está controlada por acción de la barrera de defensa antioxidante enzimática, mediada por superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y reductasa, entre otros, y no enzimática (Puerto y cols., 2009, 2010).

La principal propiedad de los estilbenos es su actividad antioxidante. Muchos estudios han demostrado que son capaces de disminuir los radicales libres (Arús y cols., 2017; Gambini y cols., 2015; Fenercioglu y cols., 2010; Rauf y cols., 2017; Reinisalo y cols., 2016), destacando la actividad del *trans*-resveratrol (Gerszon y cols., 2014; Shaito y cols., 2020), pterostilbene (Xue y cols., 2017), piceatanol (Yang y cols., 2020), oxyresveratrol (Lorenz y cols., 2003) y *trans*- ϵ -viniferina (Aja y cols., 2020; Jeon y cols., 2013) por su capacidad de capturar directamente ERO, tales como O_2 o H_2O_2 . La acción antioxidante de

los polifenoles se traduce en otras actividades potenciales, como antiinflamatoria, vasodilatadora, antitrombótica, antiapoptótica, o efectos antiaterogénicos (Reinisalo y cols., 2015; Simerol y cols., 2016).

Además, estos compuestos modulan la actividad de enzimas antioxidantes endógenas, tales como la superóxido dismutasa, catalasa o glutatión peroxidasa, e inhiben las enzimas generadoras de ERO, tales como la xantina oxidasa o la lipoxigenasa (Du y cols., 2018; Reinisalo y cols., 2015; Trembl y cols., 2019). Las mediciones de actividad de este grupo de enzimas antioxidantes pueden proporcionar un marcador de estrés oxidativo, lo que se ha completado con el estudio de otros parámetros, tales como el glutatión (GSH), malondialdehído y niveles de carbonilo (Arús y cols., 2017; Du y cols., 2018; Reinisalo y cols., 2015; Simerol y cols., 2016).

Sin embargo, la capacidad antioxidante de los polifenoles puede verse modificada cuando otras sustancias están presentes. Estas interacciones pueden dar lugar a efectos sinérgicos, antagónicos o aditivos, siendo difícil predecirlos a partir de las actividades de los compuestos individuales (Kurin y cols., 2012). En este sentido, los extractos de brotes de vid particularmente ricos en estilbenos han demostrado poseer una alta actividad antioxidante (Anastasiadi y cols., 2012; Biais y cols., 2017; Müller y cols., 2009; Ruiz-Moreno y cols., 2015).

Además, se ha demostrado que el vino posee un gran efecto antioxidante debido principalmente a las interacciones sinérgicas entre la gran variedad de polifenoles presentes (flavonoles y sus oligómeros de proantocianidina, antocianinas, estilbenos hidroxilados como resveratrol, flavonoles como kaempferol y quercetina, ácidos hidroxicinámicos como ácido p-hidroxi-cumarico y cafeico, así como elagitaninos, ácido elágico) (Barbalho y cols., 2020). Debido a esta actividad, el consumo moderado, pero regular, de vino ha sido propuesto como explicación a la “paradoja francesa”, término generado en 1992 a partir de datos epidemiológicos de franceses que tenían una baja incidencia de enfermedades coronarias a pesar del consumo de una dieta alta en grasas saturada (Renaud y Lorgeuil, 1992).

Otro de los efectos atribuidos a los estilbenos es la habilidad de proteger a las células contra el daño oxidativo producido por H_2O_2 (Gambini y cols., 2015; Rauf y cols., 2017). Esta capacidad de protección es de gran relevancia ya que este compuesto es uno de los principales mediadores del estrés oxidativo y genera roturas del ADN. En este sentido, el resveratrol ha demostrado proteger ante un daño oxidativo mediante el incremento de las actividades de la catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa (Kowalzyk y cols., 2009; Palomera-Ávalos y cols., 2017). Este efecto también ha sido evaluado con diferentes

extractos de *Vitis Vinifera* que han protegido al DNA del daño producido por ERO y H₂O₂ en células HT-29 (Esatbeyoglu y cols., 2016), HepG2 y HeLa (Apostolou y cols., 2013).

Por otro lado, debido a que los polifenoles son compuestos sensibles a la óxido-reducción (Ju y cols., 2007), dependiendo del tipo de célula, dosis y el tiempo de tratamiento, también pueden actuar como agentes pro-oxidantes, incrementando la producción de ERO (Kuršvietienė y cols., 2016; Treml et al., 2019). El resveratrol ha demostrado inducir un estado pro-oxidativo en células de leucemia *in vitro*, promoviendo la formación de radicales superóxidos (Pignitter y cols., 2016). Asimismo, el pinoestilbeno también ejerce un efecto pro-oxidante disminuyendo la expresión de la catalasa en macrófagos (Treml y cols., 2019). Este mecanismo pro-oxidante ha sido propuesto como explicación al efecto anticancerígeno de los estilbenos. En este sentido, la actividad anticancerosa del piceatanol es debida a la inducción de la formación de radicales hidroxilos dando lugar a la rotura del ADN (Li y cols., 2012).

6.4. GENOTOXICIDAD Y MUTAGENICIDAD.

El estudio de la genotoxicidad de los ingredientes tecnológicos y, por ende, de los aditivos alimentarios, es fundamental en la evaluación de riesgo de los mismos (EFSA, 2011; Gossiau, 2016) y, para ello, la EFSA desarrolló en el año 2011 una guía que indica los pasos a seguir y la batería de ensayos necesarios para cubrir este objetivo.

La genotoxicidad incluye todo proceso que altera la estructura del material genético, la información contenida en el ADN o que produce la segregación de este, incluyendo formación de aductos, rotura de la hebra de ADN o intercambio de cromátidas hermanas, entre otros (EFSA, 2011). Por otro lado, la mutagenicidad se refiere únicamente a la inducción de cambios permanentes en la cantidad o la estructura del material genético y que se transmiten entre generaciones, pudiéndose diferenciar entre las sustancias clastogénicas, que serían aquellas que producen alteración en la estructura del material genético y las sustancias aneugénicas, que serían aquellas capaces de alterar el número de cromosomas produciendo aberraciones numéricas.

Además, es necesario incorporar a estos ensayos un sistema exógeno de activación metabólica que permita biotransformar los xenobióticos en sus metabolitos, con el fin de determinar si son éstos los que producen el efecto tóxico. El sistema más utilizado es la fracción microsómica S9 obtenida de hígado de ratas tratadas con inductores enzimáticos (EFSA, 2011).

El primer nivel propuesto por la EFSA es obligatorio para todos los nuevos aditivos, e incluye ensayos de absorción, genotoxicidad *in vitro* y estudios toxicológicos de 90 días. Los ensayos requeridos de genotoxicidad *in vitro* comprenden el ensayo de mutación

reversa en bacterias o Test de Ames (OCDE 471) y el ensayo de micronúcleos (MN) (OCDE 487).

El test de Ames (Figura 9) es un ensayo biológico cuyo fin es evaluar el potencial mutagénico de la sustancia de estudio, ya sea como compuesto puro o formando parte de mezclas complejas. En este ensayo se detecta la capacidad de la sustancia de revertir mutaciones en los genes de la biosíntesis de histidina o triptófano en *Salmonella typhimurium* o *Escherichia coli*, respectivamente, restaurándose la capacidad normal de estas bacterias de sintetizar estos aminoácidos. Por lo tanto, con el test de Ames podemos detectar mutaciones puntuales generadas por sustituciones, adiciones o deleciones de uno o varios pares de bases en el ADN, revelando transiciones o transversiones y desplazamientos en el marco de lectura como mecanismos de producción de la mutación (OCDE, 2020). Además, se trata de un método rápido, sencillo de realizar y fácil de reproducir, convirtiéndose en un estudio idóneo para evaluar la mutagenicidad de sustancias (Mahadevan y cols., 2011).

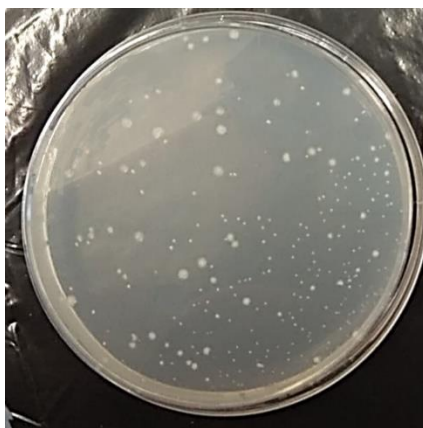


Figura 9. Visualización de resultados del Test de Ames

Por otro lado, para estudiar la frecuencia de daño cromosómico inducido por un agente, la EFSA propone el ensayo MN (Figura 10). Este método, descrito en la guía OCDE 487, permite detectar sustancias que causan la formación de MN en células que han completado una división nuclear y se encuentran en la fase binucleada del ciclo celular que contienen fragmentos cromosómicos o cromosomas completos. Esta técnica es cada vez más utilizada debido a que es rápida de realizar, fácil de analizar y permite detectar compuestos aneugénicos y clastogénicos, presentando características más interesantes que el históricamente utilizado ensayo de aberraciones cromosómicas (Corvi y cols., 2008; EFSA, 2011b; Kirkland y cols., 2011).

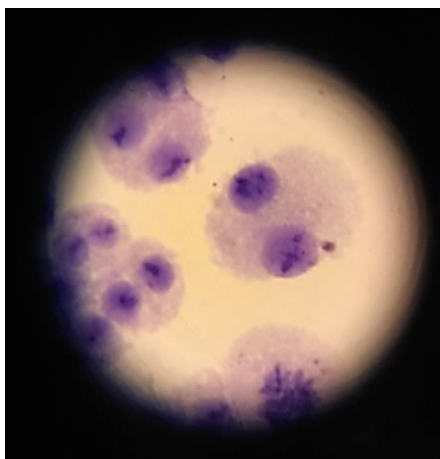


Figura 10. Visualización del ensayo de MN.

Una vez realizado estos ensayos, se plantean cinco posibles escenarios (Figura 9):

- Resultados negativos en ambos ensayos: Ante estos resultados, se determina que la sustancia de estudio no tiene potencial genotóxico *in vitro*. Sin embargo, recientemente la EFSA (2017) ha indicado que al menos un ensayo *in vivo* debe ser realizado, aunque los resultados *in vitro* sean negativos.
- Test de Ames positivo y ensayo de MN negativo: En este caso, es recomendable realizar un ensayo de mutación en roedores transgénicos (OCDE 474) o un ensayo cometa en roedores (OCDE 489), seleccionándose los tejidos diana oportunos. También la EFSA propone realizar un ensayo cometa combinado con el ensayo de MN, ya que la sustancia de estudio puede ser considerado como un potencial clastogénico.
- Test de Ames negativo y ensayo de MN positivo: En este escenario, si el compuesto estudiado tiene un efecto aneugénico o clastogénico en ausencia de la fracción microsomal S9, un ensayo de MN *in vivo* (OCDE 474) se consideraría apropiado para continuar. Por otro lado, si los datos indican un efecto clastogénico *in vitro* en presencia de S9, la EFSA recomienda un ensayo combinado de MN y cometa en roedores (Bowen y cols. 2011).
- Ambos ensayos dan lugar a resultados positivos: Aquellas sustancias que produzcan resultados positivos en los ensayos *in vitro* deben ser evaluadas *in vivo* y para ello, la guía propone distintos protocolos: MN *in vivo* (OCDE 474), ensayo cometa *in vivo* (OCDE 489) y ensayo de mutación génica en roedores transgénicos (OCDE 488).

- Resultados inconcluyentes, contradictorios o equívocos: Las sustancias que den lugar a estos resultados pueden ser evaluadas *in vitro* por otros estudios complementarios. Si los resultados siguen sin ser claros, se recomiendan el ensayo de MN *in vivo* (OCDE 474), ensayo cometa *in vivo* (OCDE 489) y el ensayo de mutación génica en roedores transgénicos (OCDE 488).

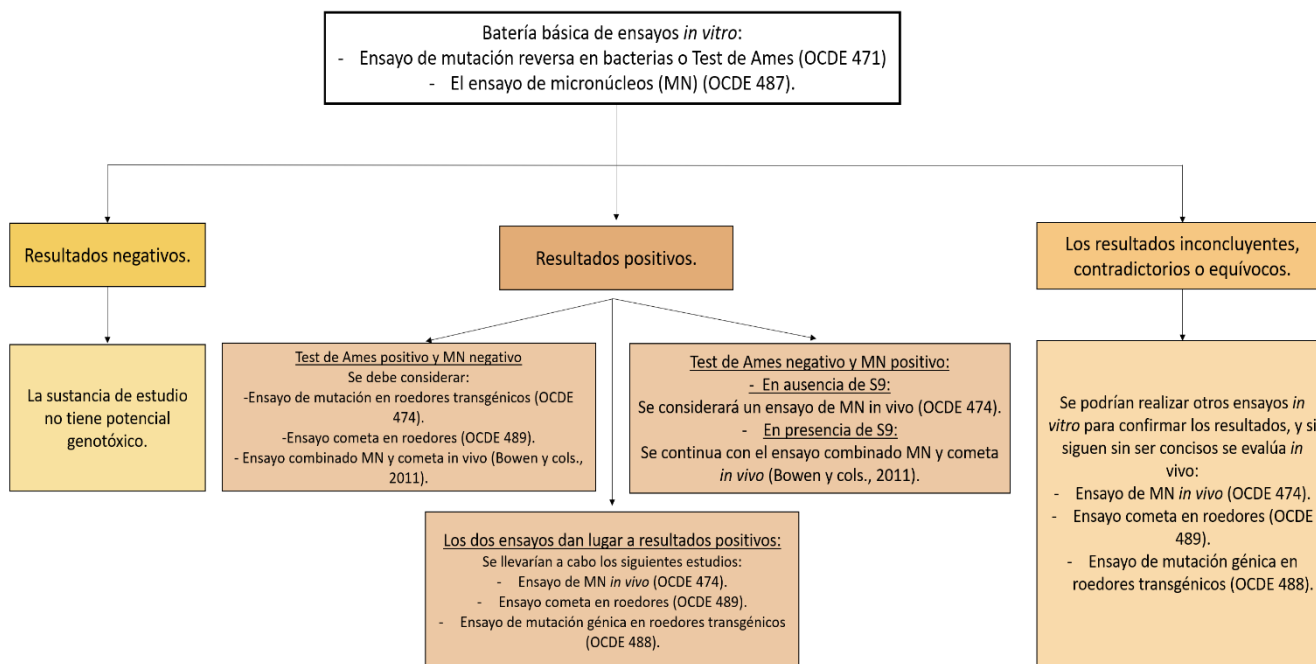


Figura 11. Esquema de la estrategia de pruebas de genotoxicidad recomendada por la EFSA.

Por otro lado, antes de realizar los ensayos *in vivo* para completar los datos obtenidos *in vitro*, se pueden llevar a cabo otros estudios complementarios. Un método de gran interés, a pesar de no estar incluido en la batería de ensayos que propone la EFSA para la evaluación de la genotoxicidad *in vitro* de los aditivos, es el ensayo cometa. Es una técnica que permite detectar sustancias que producen roturas en el ADN en células eucariotas (Collins, 2004). Además, en este ensayo pueden utilizarse enzimas de reparación con actividad glicosilasa o endonucleasa como la formamidopirimidina ADN glicosilasa (FPG) o la endonucleasa-III (Endo-III) para detectar daño oxidativo del material genético, permitiendo conocer el efecto genotóxico en sustancias con potencial prooxidante (Collins y cols., 1993). Comparado con otros métodos, el ensayo cometa presenta ciertas ventajas, como son: alta sensibilidad, rapidez, requiere un pequeño tamaño de muestra, la obtención de datos es a nivel de células individuales y se puede llevar a cabo en cualquier célula eucariota, ya sea *in vitro* o *in vivo* (Azqueta y Collins, 2008).

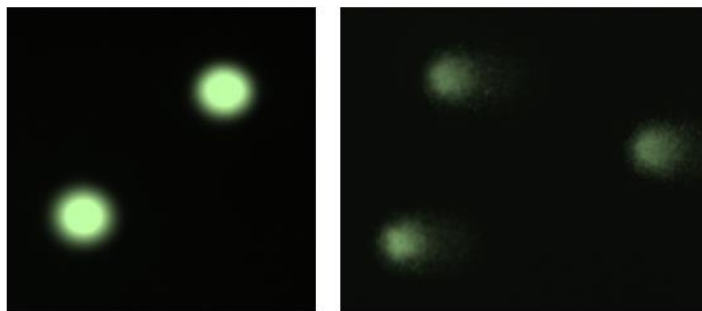


Figura 12. Visualización del Ensayo Cometa

Recientemente se ha llevado a cabo una amplia evaluación de la seguridad del *trans*-resveratrol con una pureza del 99% con el fin de utilizarlo como nuevo alimento (novel food) (EFSA, 2016). El potencial mutagénico de este estilbeno se estudió en cepas de *S. typhimurium* (TA1535, TA1537, TA98, TA100 y TA102) y *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) indicándose que en exposiciones de hasta 5000 $\mu\text{g}/\text{placa}$ no hubo indicios de una respuesta mutagénica ni en presencia ni en ausencia de la mezcla S9 (Czeczot y cols., 2003; Edwards y May, 2007; Matsuoka y cols., 2001; Sokolowski, 2012; Williams y cols., 2009). Por otro lado, el ensayo de MN detectó un aumento de MN en la línea celular L5178Y tras la exposición a *trans*-resveratrol (Schmitt y cols., 2002), y además Mizuno y cols., (2017) demostró que algunos derivados ester y amino de estilbenos también actuaron como genotóxicos en las células HepG2 y CHO-K1 aumentando la frecuencia de MN en células binucleadas. Además, el ensayo cometa ha sido utilizado *in vitro* para evaluar la genotoxicidad de resveratrol, *r2*-viniferina y hopeafenol, indicándose que ninguno de ellos produjo una rotura directa en la hebra de ADN. Sin embargo, sí se observó una oxidación de las bases púricas por parte de estos compuestos (Baechler y cols., 2014), probablemente debido a la actividad prooxidante explicada con anterioridad.

Muchos autores han destacado la actividad antimutagénica y antigenotóxica de los estilbenos. En este sentido, se ha demostrado que la *cis*- ϵ -viniferina, *trans*-resveratrol y *trans*- ϵ -viniferina poseen interesantes propiedades antimutagénicas en *Salmonella typhimurium* TA100 (Kim y cols., 2002). Además, el *trans*-resveratrol protege del daño en los cromosomas provocados por diepoxibutano, mitomicina C, patulina, radiación gamma, doxorubicina y cisplatino (Abraham y cols., 2016; Attia, 2012; Bingöl y cols., 2014; Carsten y cols., 2008; Türkez y Sisman., 2012). Asimismo, otros autores han informado del efecto protector de los estilbenos, como pterostilbeno o *trans*-resveratrol, contra el daño en el material genético producido por diferentes estímulos mediante el ensayo cometa *in vitro* (Jeong y cols., 2014; Lombardi y cols., 2015; Rossi y cols., 2013).

Por otro lado, los extractos naturales de plantas al haber sido ampliamente utilizados durante años como remedios naturales y alimentos, cabría esperar que tuvieran una baja mutagenicidad y genotoxicidad. Sin embargo, se ha demostrado que algunos de estos extractos tienen efectos mutagénicos y genotóxicos *in vitro* (Demma y cols., 2009; Elgorashi y cols., 2003, Florinsiah y cols., 2013). Los efectos observados son debido principalmente a las interacciones entre sus componentes y a los compuestos reactivos formados durante su metabolismo (Celik y cols., 2012). En este sentido, el test de Ames, ensayo de MN y ensayo cometa han sido utilizados para valorar el potencial mutagénico y genotóxico de extractos naturales obtenidos de *Vitis Vinifera*. Los resultados obtenidos son muy dispares dependiendo de la composición y el origen de estos extractos, por lo que se requiere una evaluación individual de la genotoxicidad y mutagenicidad de cada uno (Erexson y cols., 2003; Lluís y cols., 2011; Yamakoshi y cols., 2002). Por lo tanto, aunque se conozca el potencial genotóxico y mutagénico de los estilbenos de forma individual, es necesaria una evaluación genotóxica de los extractos ricos en estos compuestos para garantizar un uso seguro (Demma y cols., 2009; Surh y Ferguson, 2003).

7. EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE ESTILBENOS Y EXTRACTOS NATURALES RICOS EN ESTILBENOS *IN VIVO*.

La mayoría de los estudios realizados con estilbenos en modelos experimentales *in vivo*, se han basado en los efectos beneficiosos de éstos (Gambini y cols., 2015). Sin embargo, son necesarios ensayos *in vivo* para estudiar los mecanismos de toxicidad de un aditivo alimentario con el fin de proporcionar información sobre los cambios producidos en la sangre, órganos y tejidos y en parámetros bioquímicos clínicos, tras una exposición prolongada a esta sustancia a través de la vía oral (EFSA, 2012). Además, nos permiten detectar posibles efectos secundarios y obtener datos extrapolables al ser humano (Kirkland y cols., 2011; Gosslau, 2016).

7.1. TOXICOCINÉTICA.

Los datos toxicocinéticos obtenidos *in vivo* del *trans*-resveratrol indican que, aunque su absorción oral es al menos de un 75%, su biodisponibilidad oscila entre el 29% y 38% en roedores y menos del 1% en humanos, independientemente de la dosis (Cottart y cols., 2010; Kapetanovic y cols., 2011; Mutlu y cols., 2020). Esto es debido a su pobre solubilidad en agua (< 1 mg/mL), baja vida media (8-14 min) y rápida metabolización en conjugados glucurónidos y sulfatos fácilmente eliminados por vía urinaria (Mutlu y cols., 2020; Rege y cols., 2014). Sin embargo, a pesar de su escasa biodisponibilidad y rápida eliminación, el *trans*-resveratrol se acumula en los tejidos, incluido el cerebro, después de un tratamiento agudo o de corta duración (Rege y cols., 2014). En cuanto a la *trans*- ϵ -viniferina, los datos

sobre su toxicocinética son escasos. Se conoce que su biodisponibilidad en ratones es del 0.77% probablemente debido a su baja absorción a través del epitelio intestinal y a su intenso metabolismo hepático dando lugar predominantemente a conjugados glucurónidos en ratas y a glucurónidos y sulfatos en humanos (Courtois y cols., 2017; Kim y cols., 2017).

7.2. TOXICIDAD SUBCRÓNICA Y CRÓNICA Y CARCINOGENICIDAD.

La toxicidad subcrónica nos sirve para estudiar los efectos producidos por una sustancia de interés cuando se administra repetida o continuamente durante 90 días. La guía sobre la evaluación de riesgos de los aditivos propone realizar este ensayo (OCDE 408 con parámetros ampliados de la OCDE 407) para evaluar los posibles efectos neurotóxicos, inmunológicos o de órganos reproductivos y endocrino (EFSA, 2012). Además, podemos obtener el valor del NOAEL (non-observed effect level), es decir, de la máxima concentración o nivel de una sustancia, hallada experimentalmente o por observación, que no causa alteraciones adversas detectables en la morfología, capacidad funcional, crecimiento, desarrollo o duración de la vida de los organismos diana, distinguibles de los observados en organismos control de la misma especie y cepa, bajo condiciones definidas de exposición.

Los datos sobre la toxicidad crónica de los estilbenos y los extractos que los poseen son escasos. El *trans*-resveratrol es el único del que se tienen datos. Este compuesto se ha administrado en ratas durante 90 días con dosis de 200, 400 y 1000 mg/kg de peso corporal por día. Los únicos efectos notificados fueron una reducción del peso tras la administración de la dosis de 400 y de 1000 mg y niveles elevados de bilirrubina con la dosis más alta ensayada. Estos autores concluyeron un NOAEL de 200 mg/kg de peso por día (Johnson y cols., 2011). Resultados similares fueron obtenidos en otro estudio llevado a cabo siguiendo el protocolo OCDE TG 408. En este estudio, en el cual se evaluaron dosis del *trans*-resveratrol de 120, 300 y 750 mg/kg de peso corporal por día, se observó una reducción del peso de los animales del 10% (Edwards y cols., 2007).

El siguiente paso recomendado por la EFSA es la realización de los estudios de toxicidad crónica (12 meses) y carcinogenicidad (24 meses) en una sola especie, generalmente la rata, ya sea mediante estudios separados (OECD TG 452 y 451, respectivamente) o el estudio combinado (12 meses) (OECD TG 453). La información que se derivará de estos estudios debe incluir investigaciones histopatológicas y observaciones clínicas, incluida la oftalmología, las mediciones del peso corporal y el consumo de alimentos / agua, entre otros. Además, para los aditivos en los que las pruebas de toxicidad subaguda o subcrónica anteriores indicaron el potencial de causar efectos neurofuncionales o neuroconductuales, se deben realizar más investigaciones de dichos efectos utilizando la metodología adecuada.

En cuanto a los estudios de toxicidad crónica y de carcinogenicidad realizados con estilbenos no existe ninguno siguiendo los protocolos OECD TG 452, 451 o 453. Sin embargo, se ha llevado a cabo un estudio en ratones p53-knockout evaluando la oncogenicidad del resveratrol con una pureza del 99.5%. Para ello, se administraron por sonda dosis de 1.000, 2.000 y 4.000 mg / kg de peso corporal por día, durante 28 días consecutivos. Los resultados de este ensayo indicaron que el riñón y la vejiga son los tejidos diana de este estilbeno, pero ninguna de las dosis administradas aumentó la incidencia de neoplasia maligna o benigna en los animales (Horn y cols., 2007). A la vista de estos resultados, la EFSA ha considerado que el *trans*-resveratrol con una pureza del 99.5% no se trata de un compuesto carcinogénico (EFSA, 2016).

7.3. GENOTOXICIDAD.

Los ensayos de genotoxicidad *in vivo* son necesarios llevarlos a cabo ante unos resultados *in vitro* positivos, negativos o contradictorios (EFSA, 2009b, 2017). Estos ensayos deben ser los oportunos para demostrar la seguridad del aditivo y se realizarán de acuerdo con los principios de sustitución, reducción y refinamiento (EFSA, 2012). Tanto la estrategia propuesta por la EFSA para evaluar la genotoxicidad de las sustancias (EFSA, 2011), como la guía para la evaluación de riesgos de aditivos (EFSA, 2012), recomiendan la realización de alguno de estudios:

- Ensayo MN *in vivo* (OECD 474).
- Ensayo Cometa *in vivo*.
- Ensayo en roedores transgénicos (OECD 488).

Con el fin de disminuir el uso de animales, tiempo y costo de los ensayos, Bowen y cols., (2011) propusieron un protocolo para estudiar la genotoxicidad *in vivo* de las sustancias mediante la combinación del ensayo de MN y cometa.

Este enfoque combinado presenta ciertas ventajas ante la realización de los ensayos de manera individual. Se trata de un método más rápido, sensible y eficiente que nos permite llevar a cabo una amplia evaluación del potencial genotóxico de la sustancia de estudio pudiendo dilucidar su mecanismo de acción. Además, al realizarse en un número limitado de animales, no se necesitan grandes cantidades del compuesto a estudiar (Bowen y cols., 2011; Mughal y cols., 2010). Sin embargo, hasta la fecha no existe ningún estudio en estilbenos y extractos que los contengan que utilicen esta combinación de ensayos. No obstante, si existen estudios individuales de genotoxicidad *in vivo*.

El ensayo de MN *in vivo* ha sido utilizado para evaluar la genotoxicidad del *trans*-resveratrol, con una pureza de 99%, en células de médula ósea de ratas Sprague Dawley. En comparación con los controles, no se observaron aumentos estadísticamente significativos

en la frecuencia de eritrocitos inmaduros micronucleados ni disminuciones sustanciales en las proporciones de eritrocitos inmaduros en ninguna de las ratas tratadas a cualquier dosis (0, 500, 1000 o 2000 mg / kg de peso corporal/ día) (Williams y cols., 2009). Resultados similares también fueron obtenidos en ratas Wistar tratadas por sonda con 300, 600 o 1200 mg / kg de *trans*-resveratrol (Chetelat y cols., 2003). Estos resultados son contradictorios con los obtenidos *in vitro* (Schmitt y cols., 2002; Mizuno y cols., 2017). Existen muchas razones por las cuales el potencial genotóxico observado *in vitro* no se refleja en los ensayos *in vivo* y, por lo tanto, es crucial demostrar que los tejidos evaluados han sido expuestos a la sustancia de estudio (EFSA, 2012). En estas situaciones, la EFSA indica que, si los resultados *in vivo* son negativos, la sustancia se considerará no genotóxica, prevaleciendo sobre los datos obtenidos *in vitro* (EFSA, 2011).

Por otro lado, si el potencial genotóxico de un extracto de origen natural o mezcla es demostrado *in vitro*, se debe considerar realizar ensayos *in vivo*. En concreto, la evaluación del riesgo de los extractos o mezclas que contengan moléculas relacionadas químicamente o mezclas de isómeros es necesaria ya que, si estas moléculas de manera individual han demostrado potencial genotóxico *in vitro*, se podría esperar una potenciación del efecto genotóxico y mutagénico *in vivo* (EFSA, 2012, 2019).

Los datos publicados hasta el momento sobre la genotoxicidad *in vivo* de los extractos ricos en estilbenos son muy escasos. Recientemente, un extracto procedente de las semillas de Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) rico en dímeros de resveratrol, *trans*-resveratrol y sus glucósidos fue evaluado utilizando el ensayo de MN en ratas Wistar. Los resultados indicaron que este extracto no poseía potencial genotóxico (Tatefuji y cols., 2014).

8. OTROS ESTUDIOS DE TOXICIDAD.

Los aditivos alimentarios que muestren alcanzar la vía sistémica deben probarse en *estudios de toxicidad* para la reproducción cuyo objetivo es proporcionar información sobre los efectos y la potencia de los aditivos alimentarios en la libido masculina y femenina, la fertilidad, la capacidad de la mujer para llevar el embarazo a término, la lactancia materna y el cuidado de las crías, en el período prenatal y posnatal, entre otros. Por otro lado, es de interés la realización de ensayos para evaluar la *toxicidad del desarrollo* para identificar el potencial de una sustancia de causar efectos letales, teratogénicos u otros efectos tóxicos en el embrión y el feto.

El dietilestilbestrol se trata de un estilbeno utilizado en mujeres embarazadas entre los años 1940 y 1971 para prevenir abortos espontáneos, partos prematuros y otras complicaciones relacionadas con el embarazo. Sin embargo, se ha demostrado que este compuesto produce trastornos endocrinos pudiendo causar cáncer, defectos congénitos o

de nacimiento y otras anomalías del desarrollo. Debido a la similitud de esta molécula con el *trans*-resveratrol, se han llevado a cabo diversos estudios sobre su toxicidad para la reproducción y desarrollo. En ensayos *in vitro* el resveratrol se une a los receptores de estrógeno y actúa como un antagonista de estrógeno débil en las líneas celulares de cáncer de mama humano, sin embargo, no se encontraron signos de un efecto estrogénico en el examen histológico de ovarios *in vivo* (Pezzuto y cols., 2019).

III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

SIGNIFICANCE AND PURPOSES

Teniendo en cuenta los antecedentes descritos previamente, es de gran interés encontrar alternativas al uso del SO₂ en la industria del vino. En este sentido, y considerando la tendencia actual del mercado hacia alimentos con alto valor nutricional, microbiológicamente seguros y con los menos aditivos químicos posibles, el uso de estilbenos y extractos naturales ricos en ellos están siendo considerados. Como consecuencia de este nuevo posible uso, se hace necesaria la evaluación de la toxicidad de estos compuestos con el fin de determinar las dosis efectivas y seguras para el consumidor. Esta evaluación debe ser detallada e incluir efectos tóxicos que se producirían en líneas celulares de órganos diana y en modelos experimentales *in vivo* con el fin de obtener datos lo más certeros posibles al escenario real.

En primer lugar, hemos revisado la bibliografía existente relacionada con estudios de toxicidad *in vitro* e *in vivo* de piceatanol, pterostilbeno y ϵ -viniferin, tres estilbenos abundantes en la naturaleza y que son de gran interés en la industria alimentaria debido a sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas y beneficiosas para la salud. Sin embargo, actualmente, no existe una opinión de la EFSA respecto a la seguridad de estos compuestos. En esta revisión, se puso de manifiesto que estos estilbenos presentan una importante citotoxicidad en líneas celulares cancerígenas y no cancerígenas. Además, el daño en el ADN producido por estos compuestos se ha evaluado como mecanismos de citotoxicidad. Sin embargo, no se ha realizado la batería completa de ensayos genotóxicos *in vitro* e *in vivo* requeridos por la EFSA.

En la presente tesis doctoral hemos trabajado juntamente con la Dra. Emma Cantos-Villar del Instituto de Formación e Investigación Agraria y Pesquera (IFAPA) dentro de un proyecto coordinado. Este grupo obtuvo y caracterizó dos extractos procedentes de subproductos de la vid con un contenido de 45.4% y 99% (ST-99) de estilbenos, para utilizarlos como sustitutos totales o parciales al SO₂. En este sentido, esta tesis se centra en la evaluación de toxicidad de estos dos extractos y sus estilbenos mayoritarios, *trans*- ϵ -viniferina y *trans*-resveratrol de manera individual y en combinación con la misma proporción encontrada en el extracto de mayor riqueza (1:3.9). Todo ello, siguiendo las recomendaciones de la EFSA para la evaluación de posibles aditivos.

En primer lugar, se ha estudiado la citotoxicidad y los posibles mecanismos de acción tóxica de estos compuestos. Además, se realizó por primera vez un estudio de isobogramas con el fin de determinar el tipo de interacción entre los estilbenos. Para completar estos estudios, se evaluó su actividad antioxidante valorando su capacidad de proteger y revertir el daño producido por agentes oxidantes. La realización de estos ensayos *in vitro* se llevó a cabo en dos líneas celulares del aparato digestivo: las células hepáticas HepG2 y las intestinales Caco-2. Se seleccionaron por ser el hígado el principal órgano

involucrado en la biotransformación de xenobióticos y el intestino un importante órgano en los procesos de absorción y por lo tanto estaría mayor tiempo en contacto con las sustancias.

Una vez comprobado el potencial tóxico *in vitro* de ambos extractos, estilbenos mayoritarios y su mezcla, decidimos continuar con el extracto ST-99, ya que tenía mejor perfil toxicológico y antioxidante que el extracto de menos contenido en estilbenos. Se llevó a cabo la evaluación de su potencial mutagénico y genotóxico mediante los ensayos sugeridos por la EFSA: el test de Ames en cepas de *Salmonella typhimurium* y el ensayo de MN en células L5178Y TK[±]. Además, para completar estos resultados se realizó el ensayo cometa estándar y modificado con enzimas y se analizó la capacidad del extracto para proteger y revertir el daño en el ADN. Estos estudios dieron lugar a resultados contradictorios, por tanto, siguiendo la guía de la EFSA, fue necesario realizar ensayos *in vivo*.

El ensayo combinado de MN y cometa se realizó en ratas para garantizar la seguridad de este extracto. Además, para completar estos resultados se estudió la afectación histopatológica del estómago y el hígado de las ratas expuestas a ST-99. Por último, para determinar la presencia de los estilbenos y sus derivados en muestras biológicas se utilizó una cromatografía líquida de ultra presión acoplada a un espectrómetro de masas (UPLC-HESI-MS).

Por todo ello, los objetivos específicos establecidos en la presente Tesis Doctoral han sido:

1. Realizar una revisión bibliográfica del estado del arte actual de los datos de toxicidad *in vitro* e *in vivo* de estilbenos con implicación en la industria alimentaria y de los cuales no existe una opinión de la EFSA sobre su seguridad.
2. Evaluar el potencial tóxico *in vitro* de dos extractos ricos en estilbenos, de sus compuestos mayoritarios, *trans*- ϵ -viniferina y *trans*-resveratrol, y su mezcla con el fin de determinar los mecanismos de acción tóxica mediante ensayos citotóxicos en células HepG2 y Caco-2. Asimismo, estudiar los efectos de la combinación de los estilbenos mediante un análisis de isobogramas para conocer el tipo de interacción entre ellos. Además, estudiar las posibles alteraciones ultraestructurales producidas en las células tras la exposición a estas sustancias.
3. Investigar la actividad antioxidante y pro-oxidante de ambos extractos, estilbenos mayoritarios y su combinación valorando el contenido de especies reactivas de oxígeno y de glutatión en líneas celulares de órganos diana (HepG2 y Caco-2).

Además, estudiar su capacidad de proteger y revertir el daño causado por un agente oxidante (H₂O₂).

4. Valorar el potencial mutagénico y genotóxico *in vitro* del extracto ST-99 mediante el test de Ames en diferentes cepas de *Salmonella typhimurium* y el ensayo de MN en células L5178Y TK +/- . Igualmente, evaluar su capacidad para provocar roturas y oxidación en el ADN por el ensayo cometa estándar y modificado y estudiar la capacidad de este extracto para proteger y revertir el daño en el ADN.
5. Investigar la posible genotoxicidad *in vivo* del extracto seleccionado en roedores utilizando la combinación de ensayos de MN en eritrocitos de médula ósea y el ensayo cometa estándar y modificado en hígado, estómago y sangre. Asimismo, estudiar el daño histopatológico que causa este extracto en hígado y estómago. Identificar las sustancias o principales metabolitos en el plasma de ratas tratadas.

El trabajo experimental se ha realizado en el Área de Toxicología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, haciendo uso, así mismo, del Servicio de Biología y de Microscopía del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS). La obtención y caracterización de los extractos procedentes de la madera de la poda han sido realizadas por la Dra. Emma Cantos-Villar del Centro Rancho de la Merced, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) y por el Dr. Tristan Richard de la Universidad de Burdeos (Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, Université de Bordeaux). El análisis morfológico a nivel celular ha sido realizado en colaboración con el Dr. Francisco Javier Moreno del grupo de Citoquímica Ultraestructural del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla. Por otro lado, los estudios histopatológicos se han realizado en colaboración con el Área de Toxicología y el Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, ambos de la Universidad de Córdoba, gracias a la ayuda de la Dra. Rosario Moyano. Por último, la Dra. Stéphanie Krisa de la Universidad de Burdeos, (Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, Université de Bordeaux) ha colaborado en la detección de las sustancias activas en muestras biológicas.

Por último, para la realización de esta tesis doctoral, la doctoranda realizó una estancia internacional en la Universidad de Nottingham (Reino Unido), bajo la tutorización del Dr. Pavel Gershkovich, en la que se abordó el aprendizaje de técnicas *in vitro*, *in vivo* e *in silico* de absorción de compuestos orgánicos. Estos estudios nos permiten conocer el perfil farmacocinético y biodistribución de compuestos administrados por vía intravenosa y oral. En este sentido, se ha publicado un trabajo de investigación y recientemente se ha enviado

un segundo manuscrito en colaboración con los estudiantes de doctorado Chaolong Qin y Yenju Chu. Debido al cierre de frontera por la pandemia, la estancia tuvo que acortarse, lo que no permitió la aplicación de estas técnicas aprendidos a nuestros compuestos.

Siguiendo la normativa de la Universidad de Sevilla, el resumen, la justificación y objetivos, y las conclusiones se redactan tanto en español como en inglés para optar a la “Mención Internacional en el Título de Doctor”.

Taking into account the background previously described, finding new alternatives to the use of SO₂ in the wine industry is of great interest. In this sense and considering the increasing consumers' demand for natural food additives, the use of stilbenes and natural extracts rich in stilbenes are being considered. The safety of these compounds needs to be assured before its commercialization in order to determine the effective and safe doses for the consumer. These studies should comprise the toxic effects that would occur in target organ cell lines and *in vivo* experimental models in order to obtain the most accurate data possible.

In a first approach, we have reviewed the existing literature related to *in vitro* and *in vivo* toxicity studies of piceatannol, pterostilbene and ϵ -viniferin, three stilbenes with interesting antioxidant and antimicrobial properties. However, there is no EFSA opinion regarding the safety of these compounds. In this revision, it was shown that these stilbenes exhibit significant cytotoxicity in cancer and non-cancer cell lines. Moreover, DNA damage was studied as a mechanism of cytotoxicity, but the completed battery of *in vitro* and *in vivo* genotoxic assays required by EFSA have not been performed.

In this doctoral thesis we have continuously worked with the group of Dra. Emma Cantos-Villar from the Instituto de Formación e Investigación Agraria y Pesquera (IFAPA) within a coordinated project. This group obtained and characterized two extracts from the by-products of the wine industry with a content of 45.4% and 99% (ST-99) of stilbenes, to use them as total or partial substitutes for SO₂. In this sense, this thesis focuses on the toxicity evaluation of these two natural extracts and their main stilbenes, *trans*- ϵ -viniferin and *trans*-resveratrol individually and in combination at the same proportion found in ST-99 extract (1:3.9), following the EFSA recommendations for the evaluation of possible additives.

First, a battery of *in vitro* assays was performed in order to determinate the basal toxicity and the main mechanisms of toxicity. The first step was to study the cytotoxicity and morphological changes caused by these compounds. Also, an isobologram study was performed for the first time in order to determine the type of interaction between *trans*- ϵ -viniferin and *trans*-resveratrol. Moreover, their antioxidant activity was evaluated by their ability to reduce reactive oxygen species and enhance glutathione content, and, in order to complete these results, the capacity of these compounds to protect and reverse the oxidative damage caused by an oxidizing agent was also studied.

The cells selected to perform these *in vitro* assays were target cell lines from organs involved in the digestive process: HepG2 liver cells and Caco-2 intestinal cells. The liver is

the main organ involved in the biotransformation of xenobiotics and the intestine an important organ in the absorption processes and therefore it is considered as site-of-contact tissue.

Once the *in vitro* toxic potential of both extracts, the majority stilbenes and their mixture had been assessed, we decided to continue the evaluation with the ST-99 extract, since it had the best toxicological and antioxidant profile. Moreover, the use of this extract did not modify the sensory or alter the quality of red wine. Following the EFSA recommendations for the evaluation of substances for their possible use as additives, the next step was to study the mutagenic and genotoxic potential of ST-99 by the Ames test in *Salmonella typhimurium* strains and micronucleus (MN) test in L5178Y TK +/- cells. In addition, to complete these results, the standard and enzyme-modified comet assay was performed and the extract's ability to protect and reverse DNA damage was analyzed.

The results of these assays were contradictory. Hence, following the EFSA guidelines, it was necessary to perform the combined MN and comet test in female and male rats to guarantee the safety of this extract. Moreover, histopathological studies in stomach and liver were performed to complete these results. Finally, a UPLC-HESI-MS was used as a useful technique to identify stilbenes and their derivatives in biological samples.

Therefore, the specific objectives established in this Doctoral Thesis have been:

1. To perform a comprehensive literature review of the *in vitro* and *in vivo* toxicity of stilbenes intended to be used in the food industry.
2. To evaluate *in vitro* the toxic potential of two extracts rich in stilbenes, their main compounds, *trans*- ϵ -viniferin and *trans*-resveratrol, and their mixture performing cytotoxic assays and studying the ultrastructural alterations in HepG2 cells and Caco-2 cells. Likewise, to study the effects of the combination of stilbenes using the isobologram analysis in order to understand the interaction between *trans*- ϵ -viniferin and *trans*-resveratrol.
3. To investigate the antioxidant and pro-oxidant activity of both extracts, *trans*- ϵ -viniferin, *trans*-resveratrol and their combination, evaluating the content of reactive oxygen species and glutathione in target organ cell lines (HepG2 and Caco-2). In addition, to study their ability to protect and reverse the damage caused by an oxidizing agent (H₂O₂).

4. To assess the mutagenic and genotoxic potential *in vitro* of the ST-99 extract by the Ames test in different strains of *Salmonella typhimurium* and the MN test in L5178Y TK ⁺/₋ cells. Moreover, to evaluate its ability to cause breaks and oxidation of the DNA performing the standard and modified comet assay and to study the ability of this extract to protect and reverse DNA damage.
5. To investigate the possible *in vivo* genotoxicity of the selected extract in rodents using the combination of MN assays in bone marrow erythrocytes and the standard and modified comet assay in liver, stomach and blood. Likewise, to study the histopathological damage caused by this extract in liver and stomach. To identify the substances or main metabolites in the plasma of treated rats.

The experimental work has been performed in the Area of Toxicology, of the Department of Nutrition and Bromatology, Toxicology and Legal Medicine, Faculty of Pharmacy, University of Seville, using also the Biology and Microscopy Service of Centro de Investigación, Tecnología e Innovación of the University of Seville (CITIUS). The characterization of the extracts from the pruning wood have been conducted by Dra. Emma Cantos-Villar of the Rancho de la Merced Center, del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) and by Dr. Tristan Richard from the University of Bordeaux (Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, Université de Bordeaux). The morphological analysis has been performed in collaboration with Dr. Francisco Javier Moreno from the Ultrastructural Cytochemistry group of the Department of Cell Biology, Faculty of Biology, University of Seville. Moreover, the histopathological studies have been carried out in collaboration with the Toxicology Area and the Comparative Anatomy and Pathology Department, both from the University of Córdoba, thanks to the collaboration of Dra. Rosario Moyano. Finally, Dra. Stéphanie Krisa from the University of Bordeaux, (Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, Université de Bordeaux) has collaborated in the detection of active substances in biological samples.

For the fulfilment of this thesis, the PhD student performed an international internship at the University of Nottingham (United Kingdom) with group of Dr. Pavel Gershkovich, where the learning of *in vitro*, *in vivo* and *in silico* techniques of organic compounds absorption was addressed. Moreover, these assays permitted to evaluate the pharmacokinetic profile and biodistribution of compounds administered intravenously and orally. In this sense, one research work has been published and a second manuscript has been recently sent in collaboration with PhD students Chaolong Qin and Yenju Chu.

However, because of the pandemic situation, the internship had to be shortened, reason why the applications of these techniques could not be performed in our compounds.

Following the regulations from the University of Sevilla, the summary, significance and purposes, and conclusions have been written both in Spanish and English to aim for a PhD with International Mention.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTS AND DISCUSSION

CAPÍTULO 1 / CHAPTER 1

**Concepción Medrano-Padial, Ana Isabel Prieto,
María Puerto, Silvia Pichardo.**

TOXICOLOGICAL EVALUATION OF
PICEATANNOL, PTEROSTILBENE AND ϵ -VINIFERIN
FOR THEIR POTENTIAL USE IN THE FOOD INDUSTRY:
A REVIEW.

Food Control (en revisión/under revision), 2021.

CAPÍTULO 2 / CHAPTER 2

Concepción Medrano-Padial, María Puerto, F. Javier Moreno, Tristan Richard, Emma Cantos-Villar, Silvia Pichardo.

IN VITRO TOXICITY ASSESSMENT OF STILBENE EXTRACT
FOR ITS POTENTIAL USE AS ANTIOXIDANT
IN THE WINE INDUSTRY.

Antioxidants, 8, 467, 2020.



Article

In Vitro Toxicity Assessment of Stilbene Extract for Its Potential Use as Antioxidant in the Wine Industry

Concepción Medrano-Padial ¹, María Puerto ¹, F. Javier Moreno ², Tristan Richard ³,
Emma Cantos-Villar ⁴ and Silvia Pichardo ^{1,*}

¹ Area of Toxicology, Faculty of Pharmacy, C/Profesor García González n°2, Universidad de Sevilla, 41012 Seville, Spain; cmpadial@us.es (C.M.-P.); mariapuerto@us.es (M.P.)

² Area of Cellular Biology, Faculty of Biology, Avda. Reina Mercedes s/n, Universidad de Sevilla, 41012 Seville, Spain; onorato@us.es

³ Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Unité de Recherche Oenologie EA 4577, USC 1366 INRA, Equipe Molécules d'Intérêt Biologique (Gesvab) - Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, Université de Bordeaux, CS 50008 - 210, Chemin de Leysotte, 33882 Villenave d'Ornon, France; tristan.richard@u-bordeaux.fr

⁴ Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA), Centro Rancho de la Merced, Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible (Junta de Andalucía). Cañada de la Loba, 11471 Jerez de la Frontera, Spain; emma.cantos@juntadeandalucia.es

* Correspondence: spichardo@us.es; Tel.: +34-954-556762

Received: 19 September 2019; Accepted: 7 October 2019; Published: 9 October 2019



Abstract: The reduction of sulfur dioxide in wine is a consumer's demand, considering the allergic effects that may occur in people who are sensitive to it. Stilbenes are candidates of great interest for this purpose because of their antioxidant/antimicrobial activities and health properties, and also because they are naturally found in the grapevine. In the present study, the in vitro toxicity of an extract from grapevine shoots (with a stilbene richness of 45.4%) was assessed in two human cell lines. Significant damage was observed from 30 µg/mL after 24 h, and 40 µg/mL after 48 h of exposure. Similarly, the ultrastructural study revealed a significant impairment of cell growing. The extract was able to protect cells against an induced oxidative stress at all concentrations studied. In view of the promising results, a more exhaustive toxicological assessment of the extract is needed to confirm the safety of its further use as additive in wine.

Keywords: cytotoxicity; stilbene; wine; antioxidant; Caco-2; Hep-G2

1. Introduction

The most widely used preservative in the wine industry is sulfur dioxide (SO₂) so far. Nevertheless, the exposure to SO₂ may have health side effects such as dermatitis, urticarial, angioedema, diarrhea, abdominal pain, bronchoconstriction, and anaphylaxis [1]. Therefore, alternatives to the use of SO₂ in wines are required. Moreover, the International Organization of Vine and Wine (OIV), in agreement with previous European Commission regulations (Ruling n° 606/2009) [2], recommended that the total SO₂ content should not exceed 150 mg/L in red wines and 200 mg/L in white and rosé organic/conventional wines [3]. In this regard, the wine industry is developing strategies to reduce and/or replace SO₂. The most promising tools for the replacement of SO₂ in wine are the use of physical methods (ultrasounds, ultraviolet, pulsed electric fields, high hydrostatic pressure, etc.) and the addition of different compounds (dimethyl dicarbonate, bacteriocin, phenolic compounds, enzymes, colloidal silver complex, etc.) [1]. An alternative must be accomplished with SO₂ action on antioxidant and antimicrobial capacity, wine oenological parameters, and organoleptic characters. However, despite the antimicrobial and antioxidant properties presented by these methods, these technologies require complex and expensive equipment. Most importantly, none of them have proven to be as effective as

SO₂ by itself so far [1,3]. For the scientific community and the wine industry, it is a challenge developing new alternatives to completely or partly eliminate the use of SO₂ in the winemaking process to produce healthier wines but maintaining the quality requirements of consumers [4]. Consumers' demand for natural food additives can lead more food manufacturers to substitute synthetic antioxidants for natural antioxidant compounds [5]. In this sense, the use of phenolic compounds should be highlighted due to the favorable results recently obtained. Natural extracts rich in stilbenes have been assayed for this purpose. Grape stems extracts are especially rich in flavonoids and stilbenes, with high concentrations of *trans*-resveratrol and ϵ -viniferin, showing high antioxidant activity and good antimicrobial properties [6–9]. Thus, wines treated with extracts obtained from grapevine shoots have reported excellent enological parameters, higher color intensity, and purity than wines treated with SO₂, and satisfactory organoleptic features analysis [10,11]. Therefore, grapevine shoots have a promising development as a source of naturally available additives.

Despite natural additives are perceived as posing no health risk to consumers, the safety of these compounds needs to be assured before its commercialization [5]. In this concern, the toxicological studies required by the European Food Safety Authority (EFSA) comprise toxicokinetics, genotoxicity, and in vivo toxicity studies [12]. The first approach to the toxicity effect of any compound should be the in vitro cytotoxicity tests to define basal cytotoxicity, directly related to cell death induction. These studies are very useful to set the concentration range to perform further in vitro testing (genotoxicity studies) and confirm its safety to be used in the food industry [13].

In this regard, the cytotoxicity of different stilbenes have been already assayed in different cell lines. The viability of cultured macrophages, tumor-derived human T cells, and human epidermoid carcinoma cells have been reported to be inhibited by resveratrol and piceatannol in a concentration-dependent manner [14]. Vineatrol[®] (an extract of grapevine-shoot containing resveratrol and other stilbenes) has exhibited a higher antiproliferative effect than resveratrol *per se* in various cancer cells assayed in vitro [15–17]. However, resveratrol and Vineatrol[®]30 exerted a concentration-dependent cytotoxic effect on V79 cells, the effect being much more pronounced with resveratrol than with Vineatrol[®] [8]. Therefore, although the effect of some of the major stilbenes contained in the grapevine shoot extract is known, the concomitant presence of different stilbenes and other substances may modulate the individual response. As instance, Vineatrol[®] has a different antiproliferative activity than their main compounds, with a possible synergistic effect of both resveratrol and ϵ -viniferin [17]. For this reason, the cytotoxicity study of the extract is mandatory considering that it is not possible to infer the summative effect of stilbenes.

In addition, it is known that stilbenes have antibacterial, antifungal, cardioprotective, neuroprotective, and pharmacological properties including antiaging effects [18,19]. While its antioxidant ability can be highlighted, stilbenes are capable of scavenging or activating cellular-enzymatic antioxidant defenses decreasing the production of intracellular reactive oxygen species (ROS) [20]. However, phenolic compounds usually exhibit both antioxidant and prooxidant activities at different doses [21,22]. Consequently, the scavenging activity of the grapevine shoot extract is studied in the present work together with the oxidative stress status and the protective and reversion properties of this extract against an oxidant agent in Caco-2 and HepG2 cell lines.

Considering the promising use of this stilbene-rich extract in the wine industry, the present work studies the cytotoxicity of the extract, including Caco-2 (colorectal adenocarcinoma cells) and HepG2 (epithelial liver cancer cells). Furthermore, an exhaustive morphological assay was carried out in order to evidence ultrastructural cellular injuries that would clarify the mechanism of action of the extract. In addition, the alteration in the oxidative status and glutathione (GSH) content as well as the protective/reversion effect were investigated in both cell lines after short term exposure to this extract.

2. Materials and Methods

2.1. Supplies, Chemicals and Model Systems

Culture medium, fetal bovine serum, and cell culture reagents were provided by Gibco (Biomol, Sevilla, Spain). The rest of the chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and VWR International Eurolab (Barcelona, Spain).

The human cell lines Caco-2 and HepG2 were maintained as described in Gutierrez-Praena et al. (2012) [23].

2.2. Stilbene-Enriched Extract

The method used for the preparation of stilbene extract was reported in a previous work [24]. Grapevine shoots were harvested in 2015 in Bordeaux region (France) and were composed of a mixture of Merlot and Cabernet Sauvignon varieties of *Vitis vinifera*. Before extraction, shoots were dried in open air for at least two months. Finely ground grapevine shoots were extracted with two times 20 L of acetone-water (6:4, *v/v*) at room temperature under agitation, twice for 12 h. After filtration, acetone was removed by evaporation under reduced pressure and the aqueous phase was lyophilized. Finally, the extract was deposited on an Amberlite XAD-7 column and washed with water. The column was then eluted with acetone. The efficiency of this process is 5.5% giving 55 g of stilbene extract per kilogram of stems.

Furthermore, the extract was fractionated by centrifugal partition chromatography (CPC) using the method of Biais et al. (2017) [7]. Briefly, the extract was eluted using the biphasic Arizona solvent system K in descending mode with the organic phase acting as stationary phase. For each run, 10 g of the extract were injected. Peak detection was monitored at 254, 280, 306, and 320 nm leading to six fractions. Only the fractions containing stilbenes were collected. The nine main stilbenes were quantified by HPLC-DAD, indicating that the stilbene-enriched extract contained at least $45.38\% \pm 5\%$ of total stilbenes (*w/w*) [25]. Compounds were identified by UV spectrum and retention time from standards. *Trans*-resveratrol was quantified at 306 nm as *trans*-resveratrol; piceatannol was quantified at 320 nm as *trans*-piceid; ϵ -viniferin, *r2*-viniferin and ω -viniferin were quantified at 320 nm as ϵ -viniferin; hopeaphenol, isohopeaphenol, pallidol, miyabenol, and ampelopsin A were quantified at 280 nm as ampelopsin A [25].

2.3. Test Solutions

The range of the extract concentrations for the cytotoxicity tests was selected considering the concentration to be incorporated in wine (100 $\mu\text{g/mL}$). Serial test solutions (0–100 $\mu\text{g/mL}$) were prepared from stock solution (1000 $\mu\text{g/mL}$) in dimethyl sulfoxide (DMSO), being the final concentration in DMSO below 0.5%.

Concentrations of the extract used for both oxidative stress assays were calculated based on the cytotoxicity study previously performed. The mean effective concentration (EC_{50}) value obtained (31.18 $\mu\text{g/mL}$ and 20.56 $\mu\text{g/mL}$ in HepG2, and 55.77 $\mu\text{g/mL}$ and 39.02 $\mu\text{g/mL}$ in Caco-2 cells for 24 h and 48 h, respectively) was chosen as the highest exposure concentration, along with the fractions $\text{EC}_{50/2}$ and $\text{EC}_{50/4}$.

To measure protection and reversion abilities, test solutions of the extract to cell viability greater than 75% were selected ($\text{EC}_{50/2}$ and $\text{EC}_{50/4}$).

2.4. Cytotoxicity Assays

The exposure concentrations were prepared in medium, with the highest concentration being 100 $\mu\text{g/mL}$. For the control group culture medium without the extract was used. Moreover, a control of solvent (0.5% of DMSO) has also been included. The exposure concentrations were added to both cells and the cytotoxicity assays were performed after 24 and 48 h of exposure.

Neutral red uptake (NR) was evaluated according to Borenfreund and Puerner (1984) [26] with modifications [27]. MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium salt) reduction was measured according to the procedure of Baltrop et al. (1991) [28]. Moreover, total protein content (TP) was performed according to the procedure described by Bradford (1976) [29].

2.5. Morphological Study under Light and Transmission Electron Microscope

Light and electron microscope observations were performed according to Gutiérrez-Praena et al. (2019) [30]. Cultured cells were exposed to three different concentrations of the extract, the EC₅₀ value, and their fractions (EC_{50/2}, EC_{50/4}). HepG2 were exposed to 7.79, 15.59 and 31.18 µg/mL and Caco-2 cells were exposed to 13.90, 27.88, and 55.77 µg/mL.

2.6. Oxidative Stress and Antioxidant Ability Assays

The oxidative stress endpoints measured, ROS content and GSH levels, were carried out following the methods described in Gutiérrez-Praena et al. (2012) [23]. The results of both assays were expressed as relative light units (RLU).

For the estimation of the protection and reversion abilities of extract, H₂O₂ 100 µM was administered to induced changes in the cell membranes and antioxidant system in HepG2 and Caco-2 cells [31].

For the protection assay, after discarding the previous medium, exposure solutions (EC_{50/2} and EC_{50/4}) of the extract were first added to the cells and incubated at 37 °C for 24 h or 48 h. After the treatment time, the medium was discarded and then exposed to 100 µM H₂O₂ for 2 h. Similarly, Caco-2 and HepG2 were pre-treated with H₂O₂ for 2 h for the reversion assay and a later exposure of the extract for 24 or 48 h. Unexposed cells were included in the figures in order to compare the results with basal levels of ROS and GSH. A control of DMSO was also incorporated in all plates.

Then, both abilities were evaluated by measuring the ROS levels and GSH content as previously described.

2.7. Calculations and Statistical Analysis

All experiments were performed three times per assay. The data for all experiments were given as the arithmetic mean percentage ± standard deviation in relation to control. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's multiple comparison tests. Differences were considered significant in respect to the control group at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and at $p < 0.001$ (***).

3. Results

3.1. Presence of Stilbenes in the Extract

The main compounds were ε-viniferin (16.34%, w/w), trans-resveratrol (8.07%, w/w), isohopeaphenol (4.11%, w/w), ampelopsin A (3.21%, w/w), pallidol (3.12%, w/w), ω-viniferin (2.77%, w/w), miyabenol C (2.75%, w/w), r2-viniferin (2.24%, w/w), hopeaphenol (2.01%, w/w), and piceatannol (0.76%, w/w). The stilbene-enriched extract contained 45.38% (w/w) of total stilbenes.

3.2. Cytotoxicity Studies

Both cell types exposed to the extract underwent a concentration and time-dependent decrease in all endpoints. In HepG2 cells, after 24 h of exposure, the MTS assay indicated a significant reduction in the cellular viability at concentrations of 40 µg/mL and above, showing greater alteration than the TP and NR assays (Figure 1A). Similarly, the most sensitive endpoints after 48 h were MTS reduction and NR uptake (Figure 1B). Considering the EC₅₀ values, toxic effects were more evident in HepG2 cells in the longer exposure time, being 31.2 ± 2.4 µg/mL for 24 h, and 20.6 ± 2.7 µg/mL for 48 h of exposure.

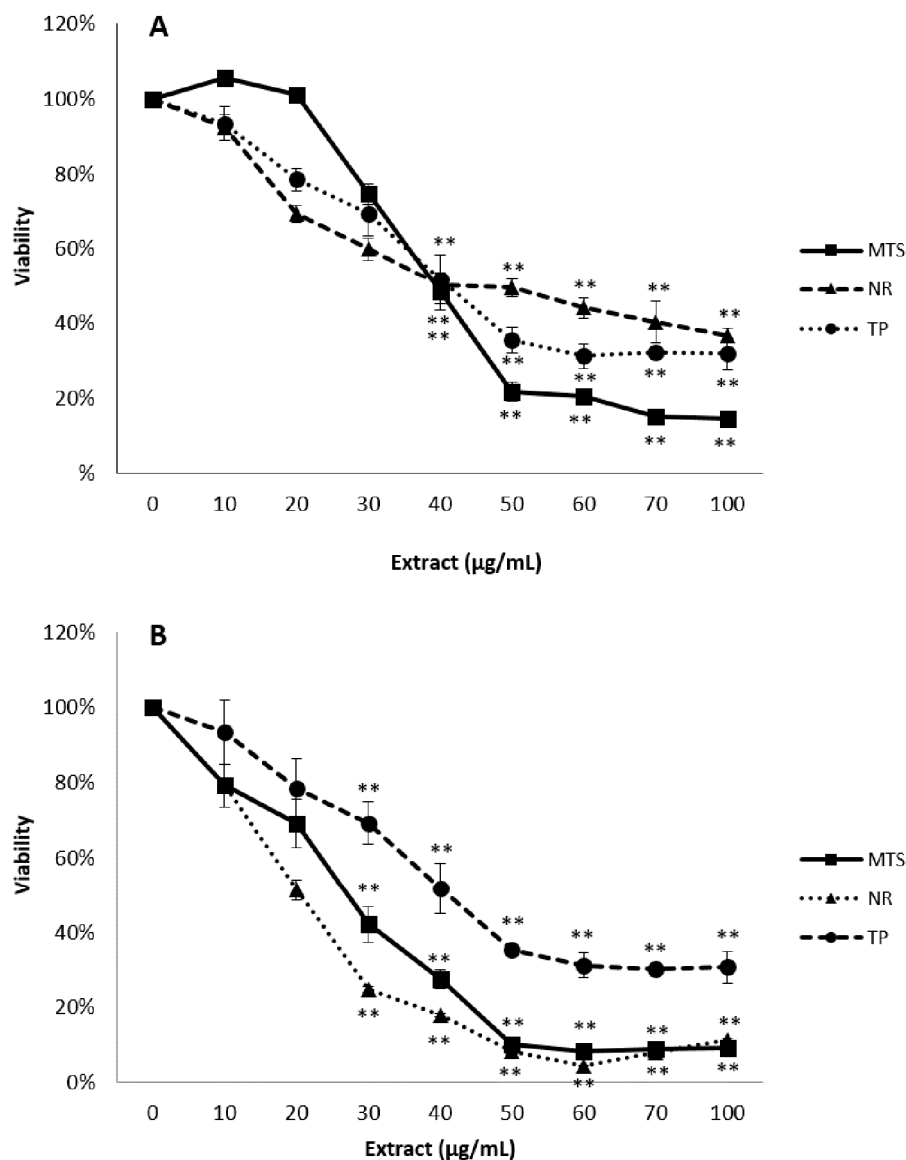


Figure 1. Reduction of tetrazolium salt (MTS), neutral rep uptake (NR), and total protein content (TP) of HepG2 cells exposed for 24 h (A) and 48 h (B) to 0–100 µg/mL of the stilbene extract (45%). All values expressed as mean ± SD. Significant differences in respect to the control from $p < 0.01$ (**).

After the exposure of Caco-2 cells to the extract, all assays showed similar concentration-dependent reduction in cell viability. MTS assay indicated a marked reduction in the cellular viability, being the EC_{50} value in this endpoint of 55.8 ± 4.0 µg/mL and 39.0 ± 2.7 µg/mL after 24 h and 48 h, respectively. These decreases were significantly different from the control group at the concentration 40 µg/mL and above at 24h, but when cells were exposed to the extract for two days, the cell viability was significantly reduced from 30 µg/mL (Figure 2).

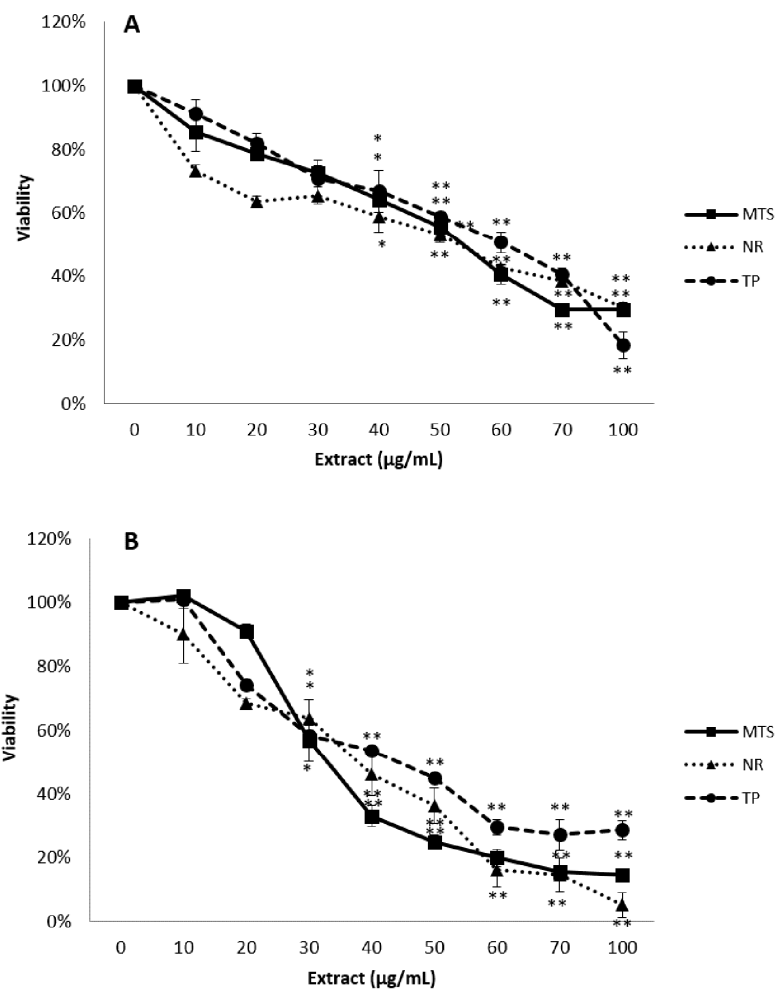


Figure 2. Reduction of tetrazolium salt (MTS), neutral red uptake (NR), and total protein content (TP) of Caco-2 cells exposed for 24 h (A) and 48 h (B) to 0–100 µg/mL of the stilbene extract (45%). All values expressed as mean ± SD. Significant differences in respect to the control from $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**).

3.3. Light and Electron Microscopic Observation in HepG2 and Caco-2 Cells

HepG2 and Caco-2 cells exposed to different concentrations of the extract experienced a significant impairment of cell growing which compromised the survival of the cells at high concentrations.

Under light microscope, unexposed HepG2 cells underwent normal mitotic processes (Figure 3A). However, when cells were treated with 15.6 and 31.2 µg/mL of the extract they revealed an intense lipid degeneration in the cytoplasm with vacuoles that tends to confluency (Figure 3B,C). Moreover, aberrant mitotic figures were also detected, which suggest that the extract was able to stop the cell growing at any step, including mitosis (Figure 3B,C). These morphological features were also observed under electron microscopy with cells showing big lipid drops (Figure 3D–F).

The damage observed in Caco-2 cells exposed to the extract was less profuse in comparison to HepG2 cells, although a marked vacuolization was shown as well as cell death. In fact, the presence of apoptotic nuclei was more frequent in the case of Caco-2 cells. Whereas cells underwent normal mitotic process in the control group (Figure 4A), aberrant mitosis can be observed from the lowest concentration assayed (13.9 µg/mL) (Figure 4B) showing the first stages in the process of apoptosis characterized by a continuous ring of condensed chromatin at the interior surface of the nuclear envelope (Figure 4C). Caco-2 cells were analyzed by transmission electron microscopy showing a nucleus with an irregular surface, decondensed chromatin, and very developed nucleoli with

well-known fibrillar center. Autophagosomal vacuoles were observed in the cytoplasm (Figure 4D). Similar findings were observed in the ultrastructural study, with the lowest concentration showing lipid degeneration (Figure 4E,F). In addition, Caco-2 cells showed big cytoplasmic inclusions as a result of autophagic processes that lead to cell death (Figure 4E,F).

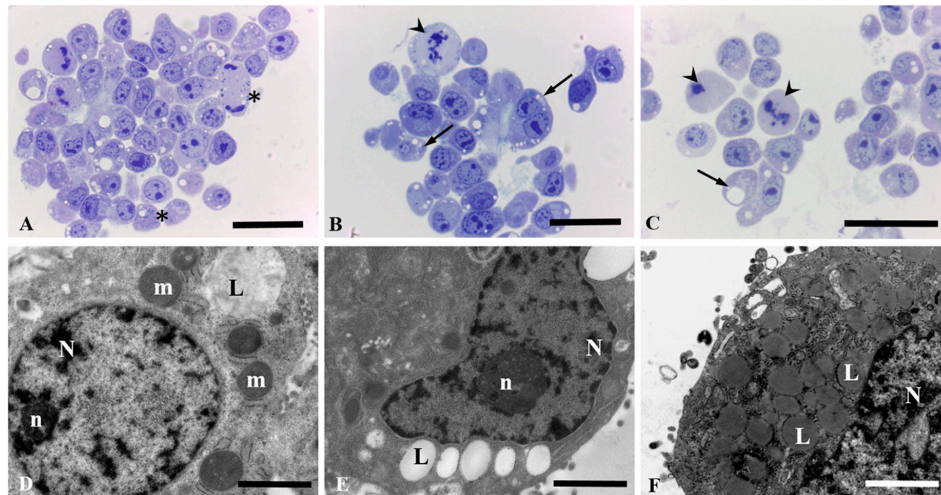


Figure 3. Morphology of HepG2 cells after 24 h of exposure to the extract observed by light microscopy (A–C, bars = 25 µm) and electron microscopy (D–F, bars = 2 µm). Unexposed control cultures (A) and HepG2 cells exposed to 7.79 µg/mL of the stilbene extract (45%) (D), 15.59 µg/mL of the extract (B,E) and 31.18 µg/mL of the stilbene extract (45%) (C,F). (A) Unexposed cells undergoing mitotic processes (arrow heads). (B) and (C) Lipid degeneration with confluent lipid drops (arrow) and aberrant mitotic figures (arrow head). (D) Cells showing nucleus (N) and nucleolus (n); mitochondria (m); lipid drops (L). (E) Big lipid drops (L); nucleus (N) and nucleolus (n) are also observed. (F) High amount of lipid drops that tends to confluency (L).

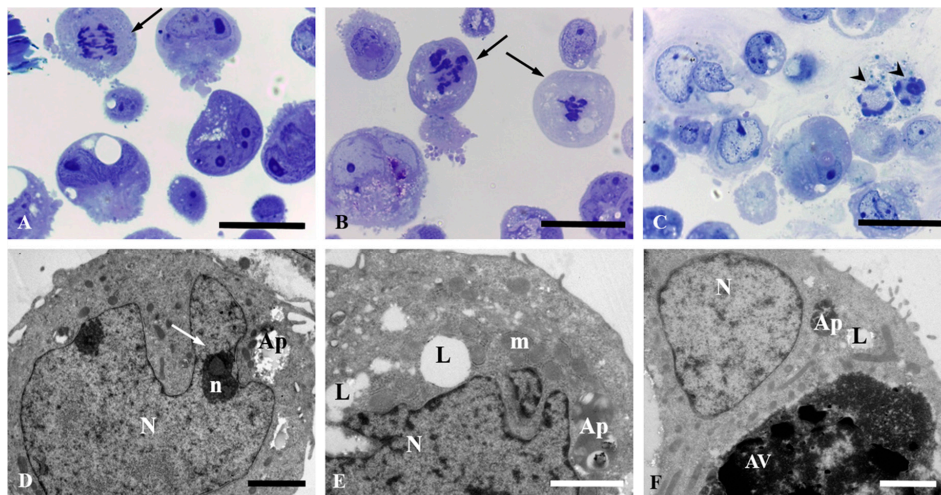


Figure 4. Morphology of Caco-2 cells after 24 h of exposure to the stilbene extract (45%) observed by light microscopy (A–C, bars = 25 µm) and electron microscopy (D–F, bars = 2 µm). Unexposed control cultures (A,D), and Caco-2 cells exposed to 13.9 µg/mL of the extract (B,E) and 27.88 µg/mL of the extract (C,F). (A) Unexposed cells undergoing mitotic processes (black arrow). (B) Cells undergoing aberrant mitosis (black arrow). (C) Cells showing apoptotic nuclei condensation (arrow head). (D) Unexposed cells showing normal nucleus with an irregular surface (N), nucleolus (n) with large fibrillar center (white arrow), and autophagosomes (Ap) in the cytoplasm. (E) Damaged nucleus and mitochondria are observed as well as big lipid drops. Autophagosomes (Ap) evidenced degenerative process. (F) Lipid drops (L), autophagosomes (Ap), and autophagic vacuoles (AV) are shown.

3.4. Oxidative Stress Assays

The control of solvent evidenced no significant changes when cells were exposed to 0.3% of DMSO. However, HepG2 cells experienced a significant decrease in ROS levels when they were exposed to all the concentrations of the extract tested after 24 and 48 h, showing a greater decrease after the exposure to 20.6 µg/mL (Figure 5A). Moreover, GSH content underwent concentration-dependent enhancements in comparison to the negative control group after both times of exposure (Figure 5B).

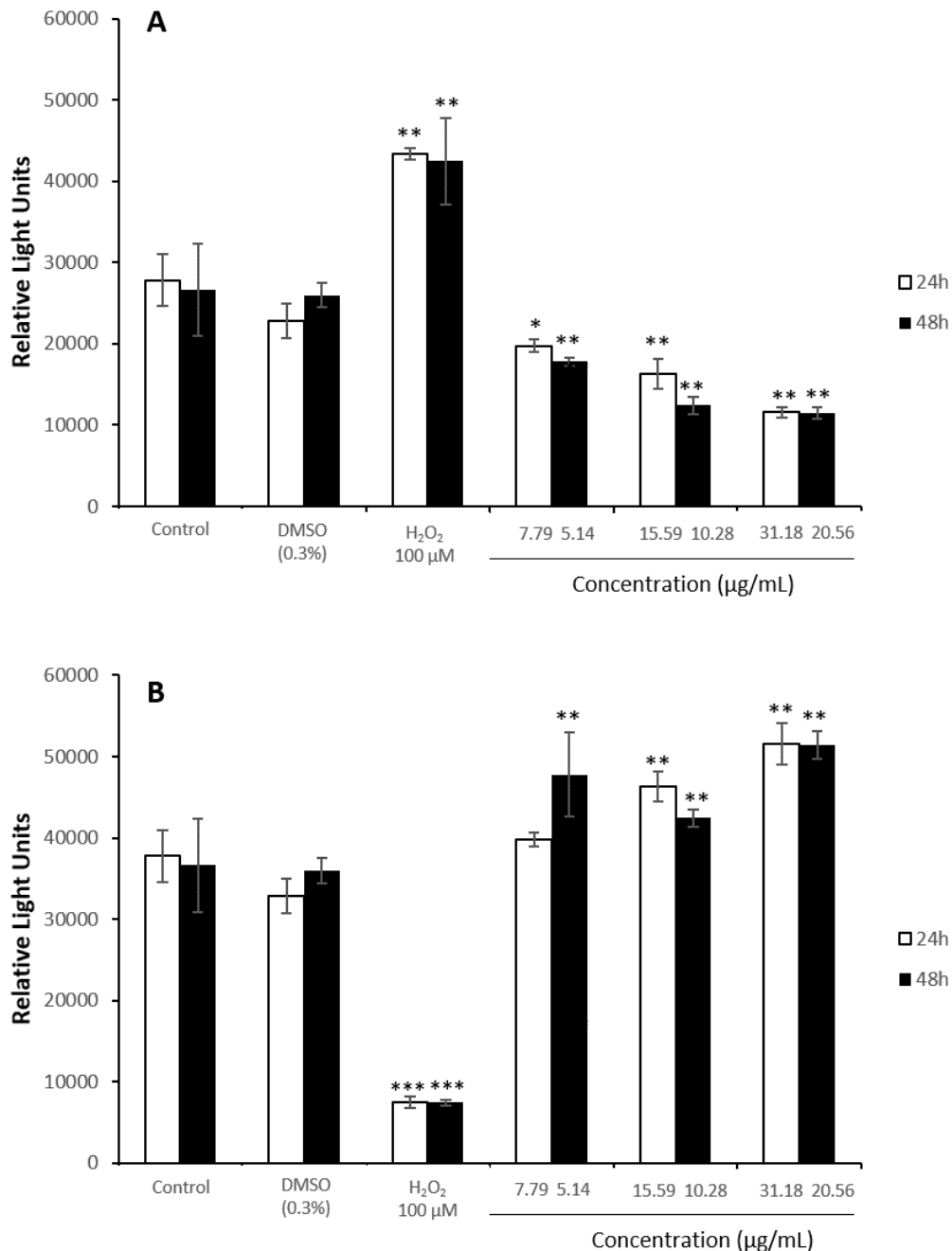


Figure 5. ROS content (A) and GSH content (B) in HepG2 cells exposed to 0–31.18 µg/mL or 0–20.56 µg/mL stilbene extract (45%) during 24 h or 48 h, respectively. All values are expressed as mean ± SD. Differences were considered significant compared to the control group from $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***).

When Caco-2 cells were exposed to increasing concentrations of the extract, ROS content was significantly reduced (Figure 6A). GSH activity was increased significantly at the highest concentrations assayed, 55.77 $\mu\text{g/mL}$ and 39.02 $\mu\text{g/mL}$ for 24 and 48 h, respectively, with enhancements of 1.6 folds compared to the control negative group (Figure 6B).

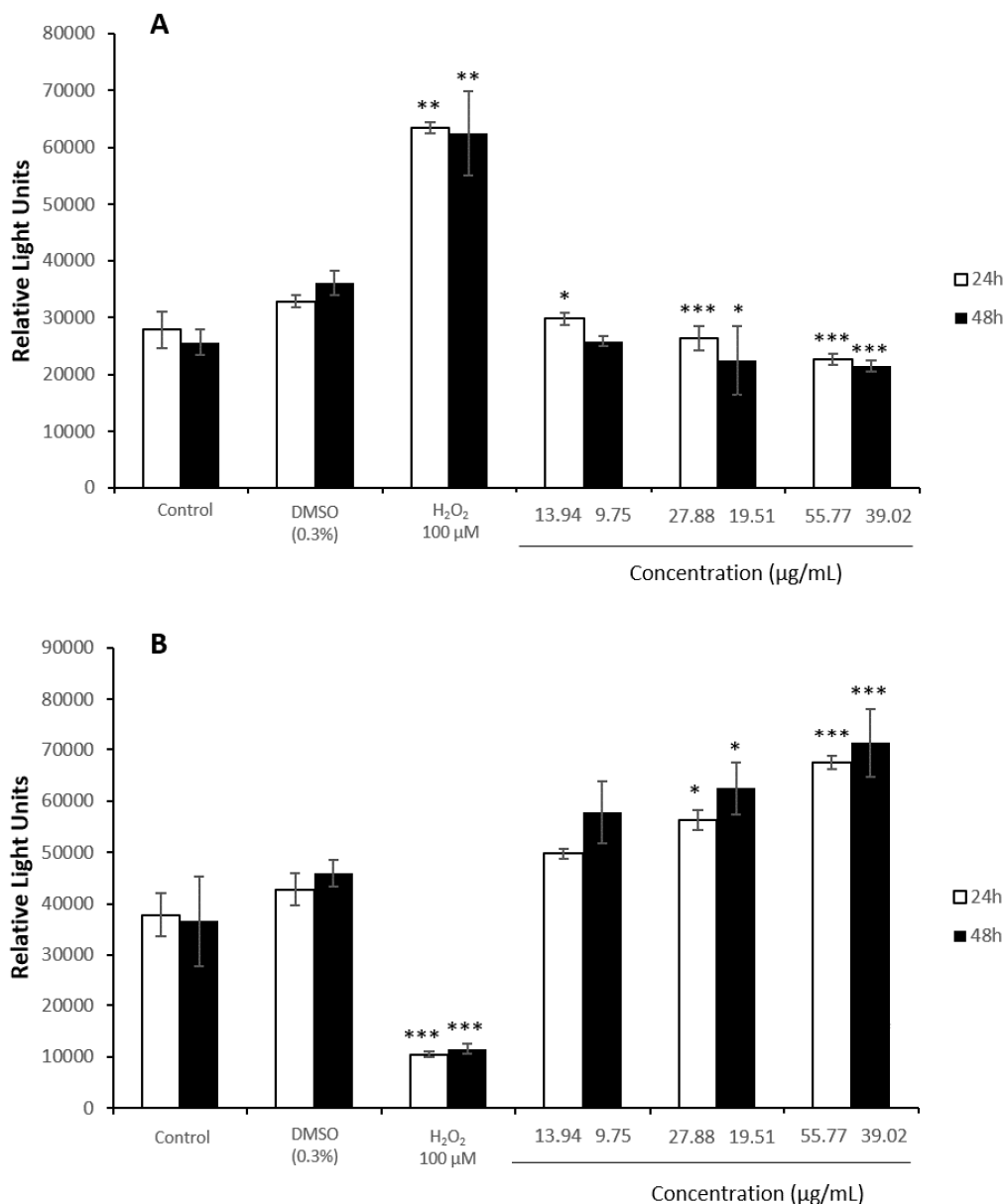


Figure 6. ROS content (A) and GSH content (B) in Caco-2 cells exposed to 0–55.77 $\mu\text{g/mL}$ or 0–39.02 $\mu\text{g/mL}$ stilbene extract (45%) during 24 h or 48 h, respectively. All values are expressed as mean \pm SD. Differences were considered significant compared to the control group from $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***)

3.5. Antioxidant Assays

The antioxidant ability of the extract was evaluated taking into account their capacity to protect the cells against a further exposure of H₂O₂ or their capacity to revert the damage induced by this substance after a previous exposure by measuring both ROS and GSH levels. No significant changes were recorded when cells were exposed to 0.3% of DMSO (data not shown).

The results showed that the extract was able to protect HepG2 cells against an induced oxidative stress at all concentrations studied, showing a marked decrease of ROS content at both treatment times (Figure 7A). Similarly, after the pre-treatment with H₂O₂ for 2 h, the extract presented a greater reversion role in a concentration and time-dependent manner. This reduced ROS content even lower than basal levels at the highest concentrations tested for 24 h and after 48 h of exposure of all studied concentrations (Figure 7B). By contrast, in both protection and reversion assays, GSH levels of the hepatic cells were not affected by the administration of 7.8 µg/mL during 24 h and 5.1 µg/mL for 48 h of the extract, while they experienced a significant increase when they were exposed to the highest concentration (Figure 7C,D). After the pre-treatment with 15.6 µg/mL and 10.3 µg/mL during 24 h and 48 h respectively and a later exposure of H₂O₂, the results showed higher GSH levels than basal content.

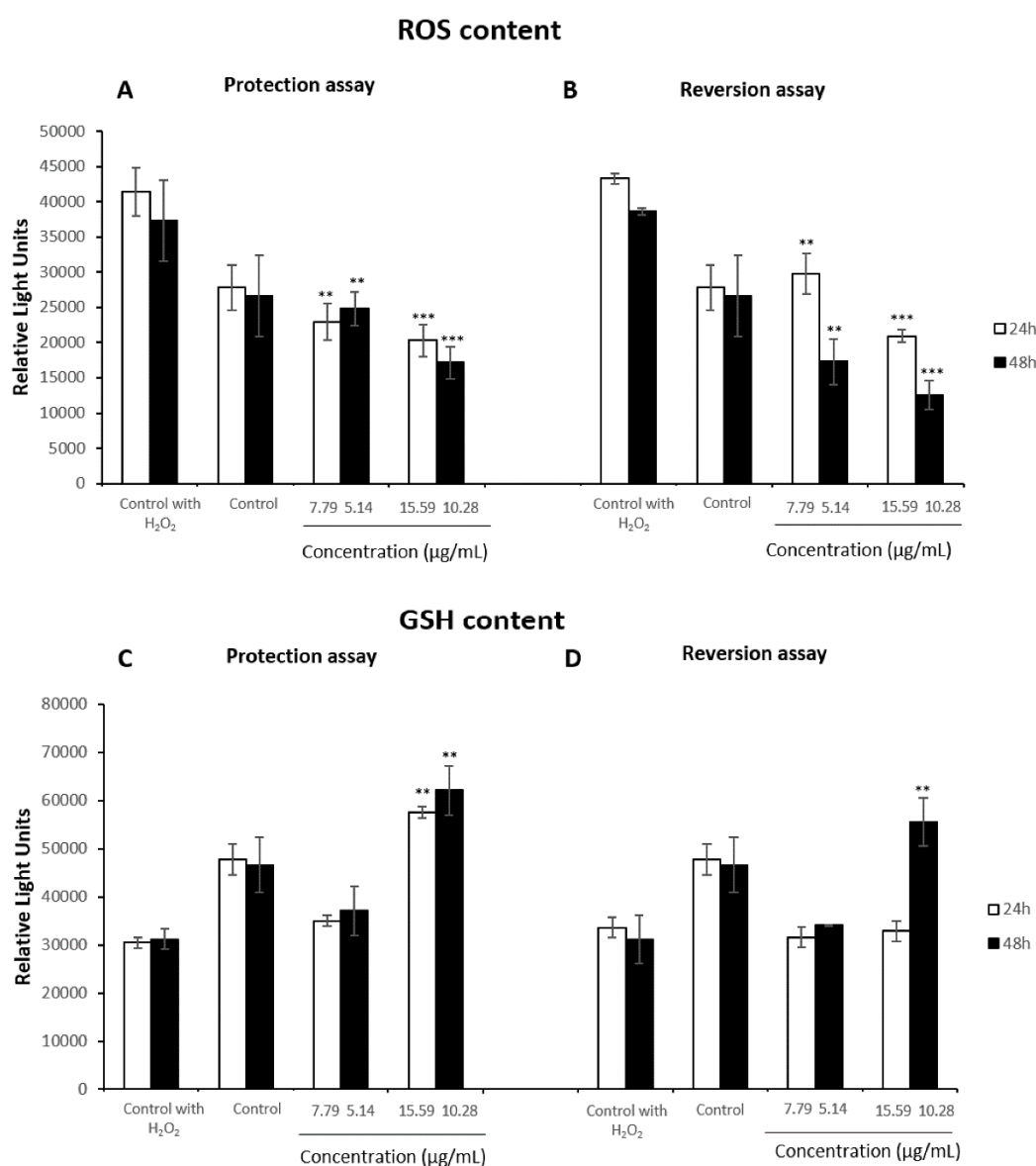


Figure 7. ROS (A) and GSH content (C) in HepG2 cells first pretreated with 0–15.59 µg/mL or with 0–10.28 µg/mL of the stilbene extract (45%) for 24 h or 48 h, respectively, and a later exposure to H₂O₂ 100 µM for 2 h. ROS (B) and GSH (D) content in HepG2 cells exposed to H₂O₂ 100 µM first and a later 24 h or 48 h-treatment with 0–15.59 µg/mL or 0–10.28 µg/mL, respectively. Cells exposed to H₂O₂ 100 µM 2h were used as control. All values are expressed as mean ± SD. Differences were considered significant compared to the control group from $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***).

The cell line Caco-2 presented lower protection and reversion capacity when compared to the effects observed in HepG2 cells. In the protection assay, the extract was able to significantly reduced ROS content with respect to the control group treated with H₂O₂ at all concentrations assayed after both pre-treatment times (Figure 8A). Similar results were obtained when Caco-2 cells were exposed to H₂O₂ prior the extract (Figure 8B). At the highest concentrations assayed ROS content was reduced down to basal levels. With respect to GSH levels, in both reversion and protection assays, GSH content were higher than basal levels after both times of treatment at the highest concentration assayed. The results showed a significant increase between control group with H₂O₂ treatment and those exposed to the highest concentration tested of the extract for 24 h and 48 h prior H₂O₂ (Figure 8C). Moreover, after the exposure to H₂O₂ for 2 h, only Caco-2 cells treated with 22.9 µg/mL during 24h or with 19.5 µg/mL for 48 h presented a significant increase of GSH levels (Figure 8D).

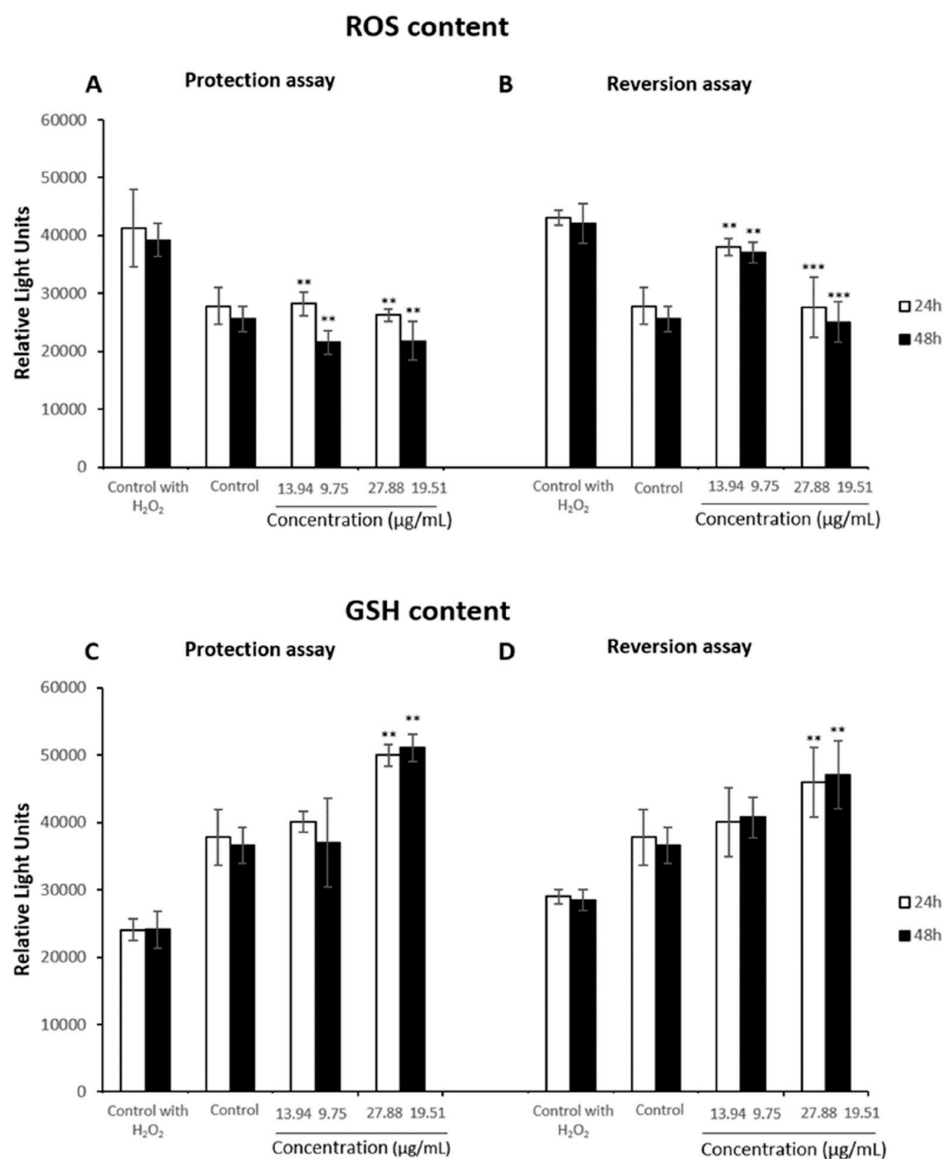


Figure 8. ROS (A) and GSH content (C) in Caco-2 cells first pretreated with 0–27.88 µg/mL or with 0–19.51 µg/mL of the extract for 24 h or 48 h, respectively, and a later exposure to H₂O₂ 100 µM for 2 h. ROS (B) and GSH (D) content in HepG2 cells exposed to H₂O₂ 100 µM first and a later 24 h or 48 h-treatment with 0–27.88 µg/mL or 0–19.51 µg/mL respectively. Cells exposed to H₂O₂ 100 µM 2 h were used as control. All values are expressed as mean ± SD. Differences were considered significant compared to the control group from $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***).

4. Discussion

Previous reports have revealed the interesting properties of stilbene-rich extracts from grapevine-shoot to be used in the vine and wine industry [3,10,23,32]. Therefore, the cytotoxicity study in human cell lines (Caco-2 and HepG2) is a key step in order to evaluate its safety. The cytotoxicity study performed in the present work evidenced that our extract (45% of stilbenes) reduced cell viability from 40 µg/mL after 24 h of exposure and from 30 µg/mL at 48 h in both cell lines. Similarly, Vineatrol® (29% of stilbenes) inhibits cell proliferation in another human colon carcinoma cell line (SW480 cells), showing a concentration and time-dependent reduction in the MTT assay [16]. The latter extract also affected cell cycle progression of different human cancer cell lines (SW480, SW620, and HTC 116), making them more prone to suffer cytotoxic effects of toxicants [33]. Moreover, these authors have previously reported that Vineatrol® disrupts cells proliferation more efficiently than resveratrol on HepG2 cells [17].

Studies using single stilbenes are more numerous in comparison to those using stilbenes extracts. In this sense, a concentration-dependent cytotoxicity of resveratrol and piceatannol have been reported in cultured macrophages, tumor-derived human T cells, and human epidermoid carcinoma cells [14]. These results showed cell inhibition at high concentration of resveratrol (50 µmol/L) in all cell types, while at low concentration (5 µmol/L) stimulation of macrophages was detected. Moreover, Colin et al. (2009) reported that the mixture of *trans*-resveratrol and ϵ -viniferin (Vineatrol®) as well as resveratrol itself affect cell cycle progression of human colon cancer cell lines [33]. Similarly, both resveratrol and Vineatrol® exerted a concentration-dependent cytotoxic effect on V79 cells, the effect being much more pronounced with resveratrol than with Vineatrol® [8]. In addition, Mizuno et al., 2017 reported that different modifications of stilbenes have different cytotoxic effect in CHO-K1 and HepG2 cells [34]. The latter authors hypothesized that the cell viability decrease may be reduced because of the appearance of necrosis or late stages of apoptosis when the metabolic activity is harshly reduced. This finding has been observed in the morphological study carried out in the present work, showing the first stages of apoptosis such as condensed chromatin in the nuclear envelope in Caco-2 cells exposed to the stilbene extract. Similarly, nuclear staining of the human colorectal cells SW480, evidenced that resveratrol-analogs and Vineatrol® preparation caused a nuclear redistribution of cyclin A, could be the first step for apoptosis considering that this finding was observed in both normal and apoptotic cells [33]. SW480 cells experienced apoptosis in a dose and time-dependent way. Moreover, the resveratrol tetramer, r-viniferin, provoked a cell cycle arrest followed by apoptosis in the prostate cancer cell line LNCaP, being this effect higher than in the exposure to resveratrol where apoptosis was not observed [35]. Also, different cultures of leukemic cells from chronic B cell malignancies and normal peripheral blood-derived mononuclear cells were exposed to Vineatrol®. Whereas impairment of cell proliferation and apoptotic processes were observed in exposed leukemic cells, the survival of normal peripheral blood mononuclear cells was little affected in the presence of these polyphenolic compounds and higher concentrations were required in order to elicit cell death [15]. This finding is particularly interesting since normal cells are usually more sensitive than cancer cell lines, highlighting the anti-cancer effect of stilbenes [36,37]. Ji et al. (2018) reported that cancer cells observed under microscope became flattened and elongated, which were morphological changes of cellular senescence [38]. In addition, resveratrol arrested cancer cell proliferation in a concentration-dependent way. However, no effect was recorded in cell viability for non-tumorigenic human breast epithelial cells MCF-10A. In this regards, Elshaer et al. (2018) reviewed the anti-cancer mechanisms of resveratrol by inducing autophagy and apoptosis [39]. In addition to death cell and autophagy, other morphological changes were observed in cells exposed to stilbenes. Scanning electron microscopy revealed that resveratrol altered the morphology of T cells and skin cells at concentrations ≥ 50 µmol/L, especially affecting the cell membrane [14]. Besides cell death, previous degradation steps have been evidenced in the present work. Hence, one of the most remarkable morphological features were presence of big lipid drops evidencing lipid degeneration, probably due to the degenerative processes in the organelles [40].

The defense against oxidative damage is one of the most commonly described characteristics of stilbenes [21]. However, phenolic compounds frequently exhibit prooxidant or antioxidant activities depending on the dose, alkali pH, high concentrations of transition metal ions, and the presence of oxygen molecules [21,41,42]. In this regard, Cotoras et al., (2014) assessed in vitro and in vivo antioxidant and prooxidant properties of phenolic compounds obtained from *Vitis vinifera* pomace, evidencing a prooxidant effect by accumulation of ROS [43]. By contrast, our results suggest that the extract modulates important functions related to the maintenance of Caco-2 and HepG2 redox environment, preventing the increase in ROS levels induced by H₂O₂, and even reverting them down to basal levels, but no prooxidant effect was recorded. Goutzourelas et al. (2015) also found that two extracts from stems of Greek grape varieties significantly decreased the ROS levels by 21.8 ± 2.0% and 16.5 ± 3.7%, respectively, compared to the control group, in C2C12 cells after 24 h of exposure [44]. This antioxidant activity can be explained by the ability of polyphenols to enhance antioxidant mechanisms, such as GSH synthesis, which acts as a scavenger to directly remove hydroxyl radical and singlet oxygen and participates in the elimination of hydrogen peroxide. In addition, Müller et al. (2009) found that the grapevine-shoot extract Vineatrol[®]30, acted as a free radical scavenger and potent antioxidant enhancing the glutathione peroxidase activity at non-cytotoxic concentrations in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells [8]. Similarly, an increase of GSH levels in endothelial cells was observed after 24 h of exposure of polyphenolic extracts derived from the stems of three Greek grape varieties [45].

5. Conclusions

Besides all beneficial abilities of stilbenes, such as antioxidant activity, they may also have potential toxic effects. In this regard, the present work entail the first approach to the toxicological studies required before being used in wines. The cytotoxicity study evidenced that the stilbene extract reduced cell viability in both cell lines in the range of concentrations from 40–100 µg/mL after 24 h of exposure and from 30–100 µg/mL at 48 h of exposure. In addition, ultrastructural changes were observed from 15.6 µg/mL in HepG2 cells and 27.9 µg/mL in Caco-2 cells, which highlighted the higher sensitivity of the morphological study in comparison to the cytotoxicity endpoints. Moreover, this work also presents a wide assessment of the prooxidant and antioxidant profile of our extract in human cells, which had not been previously studied. In general, at the exposed concentrations, the extract presented a protective and reductive role against an induced oxidative stress. Taking into account all these findings as a starting approach, more research is needed to establish effective and safe concentrations of this stilbene extract intended to be used in wines as a preservative.

Author Contributions: Formal analysis, C.M.-P., T.R. and E.C.-V.; Funding acquisition, S.P. and E.C.-V.; Investigation, C.M.-P., M.P., F.J.M. and T.R.; Methodology, C.M.-P., M.P., F.J.M. and T.R.; Project administration, E.C.-V. and S.P.; Resources, T.R. and E.C.-V.; Supervision, M.P. and S.P.; Writing—original draft, C.M.-P., F.J.M. and S.P.; Writing—review & editing, C.M.-P., T.R., E.C.-V. and S.P.

Funding: This work was supported by the Ministerio de Economía, Industria y Competitividad and INIA for the financial support for this project (RTA2015-00005-C02-02). Moreover, it was also supported by the Bordeaux Metabolome Facility and MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010 project).

Acknowledgments: The authors thank the CITIUS Biology Service (University of Seville) for the technical assistance offered. Moreover, we would like to thank M.M. Merchán-Gragero, M-L. Iglesias and A. Palos-Pinto for their technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Guerrero, R.F.; Cantos-Villar, E. Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review. *Food. Sci. Technol.* **2015**, *42*, 27–43. [[CrossRef](#)]

2. EC, European Parliament and of the Council. Directive 2006/52/EC of the European Parliament and of the Council of 5 July 2006 amending directive 95/2/EC on food additives other than colours and sweeteners and Directive 94/35/EC on sweeteners for use in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* **2006**, *204*, 10–22.
3. Cruz, S.; Raposo, R.; Ruiz-Moreno, M.J.; Garde-Cerdán, T.; Puertas, B.; Gonzalo-Diago, A.; Moreno-Rojas, J.M.; Cantos-Villar, E. Grapevine-shoot stilbene extract as a preservative in white wine. *Food Packag. Shelf Life* **2018**, *18*, 164–172. [[CrossRef](#)]
4. Santos, M.C.; Nunes, C.; Saraiva, J.A.; Coimbra, M.A. Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: Review of their potentialities and limitations. *Eur. Food Res. Technol.* **2012**, *234*, 1–12. [[CrossRef](#)]
5. Shahidi, F.; Ambigaipalan, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *J. Funct. Foods* **2015**, *18*, 820–897. [[CrossRef](#)]
6. Anastasiadi, M.; Pratsinis, H.; Kletsas, D.; Skaltsounis, A.L.; Haroutounian, S.A. Grape stem extracts Polyphenolic content and assessment of their in vitro antioxidant properties. *LWT-Food Sci. Technol.* **2012**, *48*, 316–322. [[CrossRef](#)]
7. Biais, B.; Krisa, S.; Cluzet, S.; Da Costa, G.; Waffo-Teguo, P.; Mérillon, J.M.; Richard, T. Antioxidant and Cytoprotective Activities of Grapevine Stilbenes. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 4952–4960. [[CrossRef](#)]
8. Müller, C.; Ullmann, K.; Wilkens, A.; Winterhalter, P.; Toyokuni, S.; Steinberg, P. Potent Antioxidative Activity of Vineatrol®30 Grapevine-shoot Extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2009**, *73*, 1831–1836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Ruiz-Moreno, M.J.; Raposo, R.; Cayuela, J.M.; Zafrilla, P.; Piñeiro, Z.; Moreno-Rojas, J.M.; Mulero, J.; Puertas, B.; Giron, F.; Guerrero, R.F.; et al. Valorization of grape stems. *Ind. Crop. Prod.* **2015**, *63*, 152–157. [[CrossRef](#)]
10. Raposo, R.; Ruiz-Moreno, M.J.; Garde-Cerdán, T.; Puertas, B.; Moreno-Rojas, J.M.; Gonzalo-Diago, A.; Guerrero, R.F.; Ortíz, V.; Cantos-Villar, E. Grapevine-shoot stilbene extract as a preservative in red wine. *Food Chem.* **2016**, *197*, 1102–1111. [[CrossRef](#)]
11. Raposo, R.; Chinnici, F.; Ruiz-Moreno, M.J.; Puertas, B.; Cuevas, F.J.; Carbú, M.; Guerrero, R.F.; Ortíz-Somovilla, V.; Moreno-Rojas, J.M.; Cantos-Villar, E. Sulfur free red wines through the use of grapevine shoots: Impact on the wine quality. *Food Chem.* **2018**, *243*, 453–460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. EFSA (European Food Safety Authority). Guidance for submission for food additive evaluations. *EFSA J.* **2012**, *10*, 2760.
13. Maisanaba, S.; Llana-Ruiz-Cabello, M.; Gutiérrez-Praena, D.; Pichardo, S.; Puerto, M.; Prieto, A.I.; Jos, A.M.; Cameán, A.M. New advances in active packaging incorporated with essential oils or their main components for food preservation. *Food Rev. Int.* **2017**, *33*, 447–515. [[CrossRef](#)]
14. Radkar, V.; Hardej, D.; Lau-Cam, C.; Billack, B. Evaluation of resveratrol and piceatannol cytotoxicity in macrophages, T cells, and skin cells. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* **2007**, *58*, 293–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Billard, C.; Izard, J.C.; Roman, V.; Kern, C.; Mathiot, C.; Mentz, F.; Kolb, J.P. Comparative Antiproliferative and Apoptotic Effects of resveratrol, ϵ -viniferin and vine-shots Derived Polyphenols (Vineatrols) on Chronic B Lymphocytic Leukemia Cells and Normal Human Lymphocytes. *Leuk. Lymphoma* **2002**, *43*, 1991–2002. [[CrossRef](#)]
16. Marel, A.K.; Lizard, G.; Izard, J.C.; Latruffe, N.; Delmas, D. Inhibitory effects of *trans*-resveratrol analogs molecules on the proliferation and the cell cycle progression of human colon tumoral cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 538–548. [[CrossRef](#)]
17. Colin, D.; Lancon, A.; Delmas, D.; Lizard, G.; Abrossinow, J.; Kahn, E.; Jannin, B.; Latruffe, N. Antiproliferative activities of resveratrol and related compounds in human hepatocyte derived HepG2 cells are associated with biochemical cell disturbance revealed by fluorescence analyses. *Biochimie* **2008**, *90*, 1674–1684. [[CrossRef](#)]
18. Guerrero, F.R.; García-Parrilla, M.C.; Puertas, B.; Cantos-Villar, E. Wine, resveratrol and health: A review. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4*, 635–658. [[CrossRef](#)]
19. Richard, T.; Poupard, P.; Nassra, M.; Papastamoulis, Y.; Iglésias, M.L.; Krisa, S.; Waffo-Teguo, P.; Mérillon, J.M.; Monti, J.P. Protective effect of ϵ -viniferin on b-amyloid peptide aggregation investigated by electrospray ionization mass spectrometry. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3152–3155. [[CrossRef](#)]

20. Frombaum, M.; Le Clanche, S.; Bonnefont-Rousselot, D.; Borderie, D. Antioxidant effects of resveratrol and other stilbene derivatives on oxidative stress and NO bioavailability: Potential benefits to cardiovascular diseases. *Biochimie* **2012**, *94*, 269–276. [[CrossRef](#)]
21. Ferguson, L.R. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat. Res.* **2001**, *475*, 89–111. [[CrossRef](#)]
22. Ozkan, A.; Erdogan, A. A comparative evaluation of antioxidant and anticancer activity of essential oil from *Origanum onites* (Lamiaceae) and its two major phenolic components. *Turk. J. Biol.* **2011**, *35*, 735–742. [[CrossRef](#)]
23. Gutiérrez-Praena, D.; Pichardo, S.; Jos, A.; Moreno, F.J.; Cameán, A.M. Biochemical and pathological toxic effects induced by the cyanotoxin Cylindrospermopsin on the human cell line Caco-2. *Water Res.* **2012**, *49*, 1566–1575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Gabaston, J.; El Khawand, T.; Waffo-Teguo, P.; Decendit, A.; Richard, T.; Mérillon, J.M.; Roman, P. Stilbenes from grapevine root: A promising natural insecticide against *Leptinotarsa decemlineata*. *J. Pest Sci.* **2018**, *91*, 897–906. [[CrossRef](#)]
25. Guerrero, R.F.; Biais, B.; Richard, T.; Puertas, B.; Waffo-Teguo, P.; Merillon, J.M.; Cantos-Villar, E. Grapevine cane's waste is a source of bioactive stilbenes. *Ind. Crop. Prod.* **2016**, *94*, 884–892. [[CrossRef](#)]
26. Borenfreud, E.; Puerner, J.A. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assays. *J. Tissue Cult. Methods* **1984**, *9*, 7–9. [[CrossRef](#)]
27. Zhang, S.Z.; Lipsky, M.M.; Trump, B.F.; Hsu, I.C. Neutral red (NR) assay for cell viability and xenobiotic-induced cytotoxicity in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Cell Biol. Toxicol.* **1990**, *6*, 219–234. [[CrossRef](#)]
28. Baltrop, J.A.; Owen, T.C.; Cory, A.H. 5-((3-carboxyphenyl)-3-(4,5 dimethylthiazolyl)-3-(4- sulfophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 2- (4,5- dimethylthiazolyl)- 2,5- diphenylterazolium bromide (MTT) reducing to purple water soluble formazan as cell viability indicators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, *1*, 611. [[CrossRef](#)]
29. Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)]
30. Gutiérrez-Praena, D.; Guzmán-Guillén, R.; Pichardo, S.; Moreno, F.J.; Vasconcelos, V.; Jos, A.; Cameán, A.M. Cytotoxic and morphological effects of microcystin-LR, cylindrospermopsin, and their combinations on the human hepatic cell line HepG2. *Environ. Toxicol.* **2019**, *34*, 240–251. [[CrossRef](#)]
31. Wijeratne, S.S.K.; Cuppett, S.L.; Schlegel, V. Hydrogen Peroxide Induced Oxidative Stress Damage and Antioxidant Enzyme Response in Caco-2 Human Colon Cells. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8768–8774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Schnee, S.; Queiroz, E.F.; Voinesco, F.; Marcourt, L.; Dubuis, P.H.; Wolfender, J.L.; Gindro, K. *Vitis vinifera* canes, a new source of antifungal compounds against *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, and *Botrytis cinerea*. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 5459–5467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Colin, D.; Gimazane, A.; Lizard, G.; Izard, J.C.; Solary, E.; Latruffe, N.; Delmas, D. Effects of resveratrol analogs on cell cycle progression, cell cycle associated proteins and 5fluoro-uracil sensitivity in human derived colon cancer cells. *Int. J. Cancer* **2009**, *124*, 2780–2788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Mizuno, C.S.; Ampomaah, W.; Mendonça, F.R.; Andrade, G.C.; Nazaré da Silva, A.M.; Goulart, M.O.; Alves dos Santos, R. Cytotoxicity and genotoxicity of stilbene derivatives in CHO-K1 and HepG2 cell lines. *Genet. Mol. Biol.* **2017**, *40*, 656–664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Empl, M.T.; Albers, M.; Wang, S.; Steinberg, P. The Resveratrol Tetramer r-Viniferin Induces a Cell Cycle Arrest Followed by Apoptosis in the Prostate Cancer Cell Line LNCaP. *Phytother. Res.* **2015**, *29*, 1640–1645. [[CrossRef](#)]
36. Yilmazer, A. Cancer cell lines involving cancer stem cell populations respond to oxidative stress. *Biotechnol. Rep.* **2018**, *17*, 24–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. De Filippis, B.; Ammazalorso, A.; Fantacuzzi, M.; Giampietro, L.; Maccallini, C.; Amoroso, R. Anticancer Activity of Stilbene-Based Derivatives. *Chem. Med. Chem.* **2017**, *12*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Ji, S.; Zheng, Z.; Liu, S.; Ren, G.; Gao, J.; Zhang, Y.; Li, G. Resveratrol promotes oxidative stress to drive DLC1 mediated cellular senescence in cancer cells. *Exp. Cell Res.* **2018**, *370*, 292–302. [[CrossRef](#)]
39. Elshaer, M.; Chen, Y.; Wang, X.J.; Tang, X. Resveratrol: An overview of its anti-cancer mechanisms. *Life Sci.* **2018**, *207*, 340–349. [[CrossRef](#)]

40. De Bortoli, M.; Taverna, E.; Maffioli, E.; Casalini, P.; Crisafi, F.; Kumar, V.; Caccia, C.; Polli, D.; Tedeschi, G.; Bongarzone, I. Lipid accumulation in human breast cancer cells injured by iron depletors. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2018**, *37*, 75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Blokhina, O.; Virolainen, E.; Fagerstedt, K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Ann. Bot.* **2003**, *91*, 179–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Llana-Ruiz-Cabello, M.; Gutiérrez-Praena, D.; Puerto, M.; Pichardo, S.; Jos, A.; Cameán, A.M. In vitro pro-oxidant/antioxidant role of carvacrol, thymol and their mixture in the intestinal Caco-2 cell line. *Toxicol. In Vitro* **2015**, *29*, 647–656. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Cotoras, M.; Vivanco, H.; Melo, R.; Aguirre, M.; Silva, E.; Mendoza, L. In vitro and in vivo evaluation of the antioxidant and prooxidant activity of phenolic compounds obtained from grape (*Vitis vinifera*) pomace. *Molecules* **2014**, *19*, 21154–21167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Goutzourelas, N.; Stagos, D.; Spanidis, Y.; Liosi, M.; Apostolou, A.; Priftis, A.; Haroutounian, S.; Spandidos, D.A.; Tsatsakis, A.M.; Kouretas, D. Polyphenolic composition of grape stem extracts affects antioxidant activity in endothelial and muscle cells. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *12*, 5846–5856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Goutzourelas, N.; Stagos, D.; Housmekeridou, A.; Karapouliou, C.; Kerasioti, E.; Aligiannis, N.; Skaltsounis, A.L.; Spandidos, D.A.; Tsatsakis, A.M.; Kouretas, D. Grape pomace extract exerts antioxidant effects through an increase in GCS levels and GST activity in muscle and endothelial cells. *Int. J. Mol. Med.* **2015**, *36*, 433–441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

CAPÍTULO 3 / CHAPTER 3

Concepción Medrano-Padial, María Puerto,
María del Mar Merchán-Gragero, F. Javier Moreno,
Tristan Richard, Emma Cantos-Villar, Silvia Pichardo.

CYTOTOXICITY STUDIES OF A STILBENE EXTRACT AND ITS
MAIN COMPONENTS INTENDED TO BE USED AS
PRESERVATIVE IN THE WINE INDUSTRY.

Food Research International, 137, 109738, 2020.

Journal Pre-proofs

Cytotoxicity studies of a stilbene extract and its main components intended to be used as preservative in the wine industry

Concepción Medrano-Padial, María Puerto, María del Mar Merchán-Gragero, F. Javier Moreno, Tristan Richard, Emma Cantos-Villar, Silvia Pichardo

PII: S0963-9969(20)30763-8
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109738>
Reference: FRIN 109738



To appear in: *Food Research International*

Received Date: 21 May 2020
Revised Date: 27 July 2020
Accepted Date: 3 September 2020

Please cite this article as: Medrano-Padial, C., Puerto, M., del Mar Merchán-Gragero, M., Javier Moreno, F., Richard, T., Cantos-Villar, E., Pichardo, S., Cytotoxicity studies of a stilbene extract and its main components intended to be used as preservative in the wine industry, *Food Research International* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109738>

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Cytotoxicity studies of a stilbene extract and its main components intended to be used as preservative in the wine industry

Concepción Medrano-Padial^a, María Puerto^{a*}, María del Mar Merchán-Gragero^a, F. Javier Moreno^b, Tristan Richard^c, Emma Cantos-Villar^d, Silvia Pichardo^a

^a Area of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Universidad de Sevilla, Profesor García González n°2, 41012 Seville. Spain. (cmpadial@us.es; mmerchan2@us.es; spichardo@us.es)

^b Area of Cellular Biology, Faculty of Biology, Universidad de Sevilla, Avda. Reina Mercedes s/n, 41012 Seville, Spain (onorato@us.es)

^c Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Unité de Recherche OEnologie EA 4577, USC 1366 INRA, Equipe Molécules d'Intérêt Biologique (Gesvab). Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, Université de Bordeaux, CS 50008 210, Chemin de Leysotte, 33882 Villenave d'Ornon, France. (tristan.richard@u-bordeaux.fr)

^d Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA). Centro Rancho de la Merced. Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible. Junta de Andalucía). Cañada de la Loba, km 2.1, 11471, Jerez de la Frontera, Spain. (emma.cantos@juntadeandalucia.es)

*Corresponding author:

María Puerto

Area of Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Profesor García González n°2, 41012 Seville. Spain.

E-mail address: mariapuerto@us.es

Tel: +34 954 556762

Fax: +34 954 556422

Abbreviations

EC₅₀: mean effective concentration; SO₂: sulfur dioxide. IC: Combination Index

Abstract

The use of stilbenes has been proposed as an alternative to sulfur dioxide in wine. Provided the feasibility from a technological approach, the cytotoxicity of an extract from grapevine shoots containing a stilbene richness of 99% (ST-99 extract) was assessed in the human cell lines HepG2 and Caco-2. In addition, the effects of the main stilbenes found in ST-99, *trans*-resveratrol and *trans*- ϵ -viniferin were studied, as well as its mixture. Similar cytotoxic effects were obtained in the exposures to *trans*- ϵ -viniferin, ST-99 and the mixture; however, *trans*-resveratrol alone exerted less toxicity. When HepG2 cells were exposed to *trans*- ϵ -viniferin, ST-99 and the mixture, the mean effective concentration (EC_{50}) were 28.28 ± 2.15 , 31.91 ± 1.55 and 29.47 ± 3.54 $\mu\text{g/mL}$, respectively. However, in the exposure to *trans*-resveratrol, the EC_{50} was higher $50\mu\text{g/mL}$. The morphological study evidenced damage at ultrastructural level in HepG2 cells, highlighting the inhibition of cell proliferation and the induction of apoptosis. The type of interaction produced by *trans*- ϵ -viniferin and *trans*-resveratrol mixtures was assessed by an isobologram analysis using the CalcuSyn software, evidencing an antagonist effect. These data comprise a starting point in the toxicological assessment; further studies are needed in this field to assure the safety of the extract ST-99.

Keywords: toxicity; stilbene; wine; *trans*-resveratrol; *trans*- ϵ -viniferin; wine

1. Introduction

The most widely used preservative in wine industry is sulfur dioxide (SO₂). However, many side effects have been attributed to SO₂ in sensitive human such as dermatitis, urticarial, angioedema, diarrhea, abdominal pain, bronchoconstriction, and anaphylaxis (Guerrero et al., 2015). In addition, the European Food Safety Authority (EFSA) has recently recommended that the temporary group acceptable daily intake (ADI) for SO₂ should be re-evaluated (EFSA, 2016a). The Panel also concluded that exposure estimates to SO₂ and sulfites were higher than the group ADI of 0.7 mg SO₂ equivalent/kg bw per day for all population groups. Moreover, consumers demand products containing natural ingredients, due to an increase in green awareness. Considering all this background, the wine industry is searching for new alternatives to SO₂ trying to avoid synthetic preservatives. One of the most promising alternatives is the use of phenolic compounds. Natural extracts rich in stilbenes have been assayed for this purpose (Raposo et al., 2016). Grapevine shoot are particularly rich in stilbenes, with *trans*-resveratrol and *trans*- ϵ -viniferin present in considerably high amounts (Anastasiadi et al., 2012; Guerrero et al., 2016), showing high antioxidant and antimicrobial properties (Biais et al., 2017; Müller et al., 2009; Ruiz-Moreno et al., 2015). In fact, previous studies carried out in our laboratory have checked the safety and usefulness of a stilbene extract containing 45.4% of stilbenes (Medrano-Padial et al., 2019). Further processes were able to obtain an extract with higher percentage of stilbenes (99%) named ST-99, which has proved to have good properties to be used as preservative in wines (data non-published). The next step is now to check its safety regarding consumers.

The EFSA in the guidance on safety assessment of botanicals and botanical preparations intended for use as ingredients in food supplements (EFSA, 2009) advises that the studies to probe their safety should be carried out in accordance with the principles of reduction, refinement and replacement. According to this guidance, the first step should be in vitro studies. Moreover, in chemical mixture toxicology, it is essential

first to evaluate the toxicity profile with *in vitro* approaches that will provide important information related to the mode of action (Hernandez et al., 2019). Therefore, the present work aims to assess the cytotoxicity of the ST-99 extract in two human cell lines, HepG2 (liver hepatocellular cells) and Caco-2 (epithelial colorectal adenocarcinoma cells). The toxicity of synthetic *trans*-resveratrol is well characterized as summarized in the scientific opinion about its safety to be used as a novel food (EFSA, 2016b). The Panel concludes that synthetic *trans*-resveratrol does not raise safety concerns at the intended intake level of 150 mg/day for adults. The toxicity of *trans*- ϵ -viniferin has been faintly studied so far. Some of the authors studying the effect of this compound reported no cytotoxic effect of *trans*- ϵ -viniferin at low concentrations. Hence, Richard et al. (2011) evidenced that *trans*- ϵ -viniferin glucoside did not significantly affect the viability in the neuronal cells PC12 exposed up to 10 μ M. Similarly, *trans*- ϵ -viniferin had no cytotoxic effect on neurons and astrocytes at concentrations lower than 10 μ M. Indeed, they found that *trans*- ϵ -viniferin preserved neuronal integrity at 1 μ M (Vion et al., 2018). The cytotoxicity activity of *trans*- ϵ -viniferin against mouse lymphoma cells (P-388) revealed a half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of 18.1 \pm 0.7 μ M (Muhtadi et al., 2006). Moreover, Nivelles et al. (2018) demonstrates that *trans*- ϵ -viniferin present antitumoral activities on human melanoma cells without toxicity on normal human dermal fibroblasts at concentrations of 60-85 μ M. Consumers are exposed to stilbenes by ingestion of different foods that naturally contain them, such as wines, berries, peanut and its derivatives, pistachio, nuts, dark chocolate, and grapes and their derivatives and herbal plants contain (Baur and Sinclair, 2006; Bavaresco et al., 2016; Guerrero et al., 2009; 2020). In this sense, the amount of stilbenes daily intake is highly different around the world according to the type of diet (El Khawand et al., 2018). However, due to this new application in the food industry, the intake of these stilbenes may increase, and consequently an accurate toxicological assessment is required.

Hence, the present work studied the cytotoxicity of the most relevant biologically active constituents found in a grapevine shoot extract; *trans*-resveratrol and *trans*- ϵ -viniferin, were also performed, alone and in a mixture of both with the same proportion found in the extract (1:3.9). In addition, the effects of their combinations were studied by an isobologram analysis in order to detect potential interactions between both stilbenes. Moreover, the ultrastructural study performed in both cell lines exposed to the extract and the mixture of stilbenes helped to clarify in the mechanism of action of the extract.

2. Materials and methods

2.1. Supplies and chemicals

Culture medium, fetal bovine serum and cell culture reagents were obtained from Gibco (Biomol, Sevilla, Spain). Chemicals for the different assays were provided by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain), (Biotech Ibérica, Madrid, Spain) and VWR International Eurolab (Barcelona, Spain).

Trans-resveratrol was provided by Sigma–Aldrich ($\geq 99\%$ pure as determined by HPLC). *Trans*- ϵ -viniferin was obtained from grapevine stems harvested in Bordeaux region (France) and were composed of a mixture of Merlot and Cabernet Sauvignon varieties of *Vitis vinifera*. *Trans*- ϵ -viniferin (98%) was purified by preparative HPLC as reported by Gabaston et al. (2018).

2.2. Grapevine-shoot extract preparation and test solutions

The protocol used to obtain the grapevine-shoot extract was reported in a previous work (Gabaston et al., 2018). Dried and finely ground vineshoot of *V. vinifera* cv. were extracted with acetone–water (6:4, v/v) at room temperature under agitation, twice for 12 h. After filtration, the solution was submitted to evaporation under reduced pressure and lyophilised. Finally, the extract was deposited on an Amberlite XAD-7 column and washed with water. The column was then eluted with acetone. The solvent was

evaporated until dryness. The extract was first solved in Arizona K solvents and filtrated. Furthermore, the extract was fractionated by centrifugal partition chromatography (CPC) and analyzed by UHPLC-MS using the method developed by Biais et al. (2017). The stilbene fraction enriched in *trans*-resveratrol and *trans*- ϵ -viniferin was collected and named ST-99. The ST-99 extract contained at least 99% of total stilbenes (w/w), being the main stilbenes found *trans*- ϵ -viniferin (70%) and *trans*-resveratrol (18%). Other stilbenes found in a lower percentage are vitisin B (4%), *w*-viniferin (4%), *cis*- ϵ -viniferin (1%), miyabenol C (1.5%), and *cis*-resveratrol (0.5%)

The range of the extract and *trans*- ϵ -viniferin concentrations for the cytotoxicity tests was selected considering the concentration to be incorporated in wine (100 mg/L). However, in the case of *trans*-resveratrol, the maximum concentration used was 50 μ g/mL because it was the highest concentration showing adequate solubility and it is within the concentration range of this compound that will reach the consumer. Serial test solutions (0-100 μ g/mL) were prepared from stock solution (1000 μ g/mL) in dimethylsulfoxide (DMSO), being the final concentration in DMSO below 0.5%.

2.3. Model systems

The Caco-2 cell line derived from a human colon carcinoma (HTB-37) and HepG2, a human hepatocellular carcinoma epithelial cell line (HB-8065), were maintained at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂ at 95% relative humidity (CO₂ incubator, Nuairé®, Spain). Caco-2 cells were cultured in a medium consisting of Eagle's medium (EMEM) supplemented with 20% foetal bovine serum (FBS), 1% non-essential amino acids, 50 g/ml gentamicin, 2 mM L-glutamine and 1 mM pyruvate. HepG2 cells were cultured in monolayer in EMEM supplemented with 10% of FBS, 100 U/ml penicillin and 2 mM L-glutamine. Cells were grown 80% confluent in 75-cm² plastic flasks and harvested 3 times weekly (1:2 split ratio) with 0.25% trypsin.

2.4. Cytotoxicity assays

For the cytotoxicity assays, both cell lines were seeded in 96-well culture plates. HepG2 cells were plated at density of 5×10^4 cells/ well and Caco-2 cells at 7.5×10^5 cells/ well to perform the experiments.

A wide range of concentrations in medium was prepared from the initial solution of 100 $\mu\text{g/ml}$. Culture medium without the extract was used as a control group. A control of solvent (0.5% of DMSO) was also included. The cytotoxicity assays were performed in cells exposed for 24 h and 48 h to ST-99 extract, *trans*-resveratrol, *trans*- ϵ -viniferin and the mixture of both stilbenes in the same ratio that they are found in the extract (1:3.9). Neutral red uptake (NR) was measured as described in Borenfreund & Puerner (1984). MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium salt) reduction was evaluated according to Baltrop et al. (1991). The protein content (PC) assay was performed according to the procedure given by Bradford (1976).

2.5. Assessment of the effect of stilbenes combination by the isobolograms method

In order to assess the effect of the stilbene's combination, cells were exposed to different concentrations, which were selected from the cytotoxicity tests of single stilbenes. The mean effective concentration (EC_{50}) values obtained for the most sensitive endpoint at 24 h were chosen as the highest exposure concentrations, along with $EC_{50}/2$ and $EC_{50}/4$ fractions. Thus, cells were exposed for 24 h and 48 h to binary pure stilbenes mixtures: EC_{50} *trans*-resveratrol + EC_{50} *trans*- ϵ -viniferin, $EC_{50}/2$ *trans*-resveratrol + $EC_{50}/2$ *trans*- ϵ -viniferin and $EC_{50}/4$ *trans*-resveratrol + $EC_{50}/4$ *trans*- ϵ -viniferin. Moreover, each concentration used in the combinations was evaluated alone. All experiments were performed by triplicate.

The isobologram analysis was carried out as described in Tatay et al. (2014), with modifications (Gutiérrez-Praena et al., 2019).

According to Chou and Talalay (1984) and Chou (2006), the isobologram analysis involves plotting the concentration–effect curves for each compound and its combinations in multiple diluted concentrations by using the median-effect equation.

$$fa/fu = (D/D_m)^m$$

D is the concentration of the stilbene, D_m the median-effect dose, fa is the fraction affected by D, fu is the unaffected fraction, and m is the coefficient signifying the shape of the dose–effect relationship. The method considers both the potency (D_m) and the shape (m).

This single-dose equation can be extended for a multiple combination of stilbenes as follows:

$$[(fa)_{1,2} / (fu)_{1,2}]^{1/m} = D_1 / (D_m)_1 + D_2 / (D_m)_2 + (D)_1 (D)_2 / (D_m)_1 (D_m)_2$$

This method provides the combination index (CI), which is useful for the quantification of synergism, additivity or antagonism of two compounds.

$$CI = D_1 / (D_x)_1 + D_2 / (D_x)_2$$

$$D_x = D_m [fa / (1-fa)]^{1/m}$$

$$CI = (D)_1 / (D_m)_1 [fa / (1-fa)]^{1/m_1} + (D)_2 / (D_m)_2 [fa / (1-fa)]^{1/m_2}$$

$(D_x)_1$ and $(D_x)_2$ are for D_1 and D_2 alone, respectively, that present a % effect on a system. When the $CI < 1$, this suggests synergism; when $CI = 1$, it indicates additivity; and when $CI > 1$, it refers antagonism. The CI_{50} , CI_{75} and CI_{90} are the CI values at 50%, 75% and 90% inhibition, respectively. These CI values were calculated by the CalcuSyn software (version 2.1.) (Biosoft, Cambridge, UK, 1996–2007). The parameters D_m , m , and r of the combinations are the antilog of x-intercept, the slope and the linear correlation coefficient of the median-effect plot, respectively, and they give information about the shape of the concentration–effect curve.

2.6. Morphological study under transmission electron microscope

Electron microscope observations were performed according to Gutiérrez-Praena et al. (2019). Cultured cells were exposed to three different concentrations of the extract and the mixture, the EC_{50} value and their fractions ($EC_{50}/2$, $EC_{50}/4$). HepG2 were exposed to 31.91, 15.95, and 7.98 $\mu\text{g/ml}$ for the extract; and 29.47, 14.73, and 7.37 $\mu\text{g/ml}$ for the mixture.

2.7. Calculations and statistical analysis

Data for the concentration-dependent cytotoxicity relationships of all experiments were expressed as the arithmetic mean percentage \pm standard deviation (SD) in relation to control. Statistical analysis performed was the analysis of variance (ANOVA), and further the Dunnett's multiple comparison tests was used. The normality of the distribution and the homogeneity of variances were confirmed using Kolmogorov and Smirnov's test, and Bartlett's test, respectively. All the analysis was carried out using GraphPad InStat software (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Differences were considered significant in respect to the control group at $p < 0.01$ (*), $p < 0.05$ (**) and at $p < 0.01$ (***). EC_{50} values were achieved by linear regression in the concentration-response curves.

3. Results

3.1. Cytotoxicity studies of ST-99, individual stilbenes and their mixture.

The EC_{50} values corresponding to the cytotoxicity assays of HepG2 and Caco-2 cells exposed to ST-99 extract, individual stilbenes and their mixture are shown in table 1. In the case of *trans*-resveratrol the EC_{50} values in both cells could not be calculated because the highest concentration assayed (50 $\mu\text{g/mL}$) at 24 h did not reduce cell viability below 50%. In the other exposures, the EC_{50} values selected to be included in the table 1 were lowest found in each endpoint.

HepG2 cells exposed to the extract underwent a time-dependent decrease in all the endpoints studied. The MTS assay showed significant changes respect to the control from 30 µg/mL for 24 h and 48 h. Moreover, TP in HepG2 cells exposed to the extract also indicated significant reduction in cellular viability from 40 µg/mL at 24 h and from 30 µg/mL at 48 h. Similarly, NR uptake revealed marked decrease in cell viability at 40 µg/mL after both exposure time (Fig. 1 A and B). The exposure to the mixture *trans*-resveratrol/*trans*-ε-viniferin, in a proportion (1:3.9), caused a marked decreased in all endpoints in the hepatic cells. After 24h of exposure, significant changes were observed from 30 µg/mL, 50 µg/mL and 70 µg/mL by MTS, RN and PT assays, respectively (Fig. 1C). After 48h, MTS and TP showed a similar decrease in HepG2 viability, being significant from 30 µg/mL (Fig. 1D).

In the exposure of HepG2 to the single stilbenes, different results were obtained for each stilbene. While significant decreases were recorded in the case of *trans*-ε-viniferin at both exposure times from 30 µg/mL for 24 h and 20 µg/mL at 48 h (Fig. 2 A and B), *trans*-resveratrol did not induce a decrease higher than 50% in any of the tested concentrations (0-50 µg/mL) after 24 h of exposure (Fig. 2 C). At longer exposure time, a steady decrease of all the assays was also observed, showing significant results from 35 µg/mL in TP assay and from 40 µg/mL in MTS metabolism and NR uptake assays (Fig. 2D).

In Caco-2 cells exposed to the stilbene extract for 24 h and 48 h, all tested endpoints revealed a sharp viability decrease. TP content was the most sensitive parameter, showing significant decreases from 20 µg/mL of the extract during 24 h and 48 h. RN assay revealed marked changes from 20 µg/mL and 30 µg/mL for 24 h and 48 h respectively. Similarly, MTS metabolism indicated significant differences from control after the exposure of 30 µg/mL for 24 h and from 20 µg/mL at 48 h (Fig. 3 A and B). In contrast, only after the exposure to 70 µg/mL of the mixture (1:3.9) changes respect to the control were observed at 24 h in all endpoints (Fig. 3 C). A concentration-dependent decrease is also shown after 48 h of exposure to mixture. Both TP and MTS assays

indicated significant differences from 40 $\mu\text{g/mL}$, while this effect was observed after the exposure to 50 $\mu\text{g/mL}$ in the RN uptake assay (Fig. 3 D).

When Caco-2 cells were exposed to *trans*- ϵ -viniferin, a concentration and time-dependent decrease was recorded in all endpoints. MTS metabolism and PT content were remarkably reduced from 30 $\mu\text{g/mL}$ after 24 h (Fig. 4 A). Similarly, the exposure from 40 $\mu\text{g/mL}$ in colon cells affected RN uptake. After 48 h, 20 $\mu\text{g/mL}$ of *trans*- ϵ -viniferin caused significant reduction of cell viability in all three assays (Fig.4B). However, *trans*-resveratrol did not produce a reduction greater than 50% in Caco-2 viability after 24 h at the concentrations assayed. Only after the exposure of the highest concentration tested (50 $\mu\text{g/mL}$), variations respect to the control were observed (Fig. 4C). After 48 h of exposure, RN and TP assay revealed this decrease at 40 $\mu\text{g/mL}$, while MTS metabolism showed significant reductions at 50 $\mu\text{g/mL}$ (Fig.4D).

3.2. Isobologram analysis of stilbenes combination.

The isobologram analysis is shown in the Figure 5, which represents the CI/fraction affected (fa) curves for stilbenes combination in both cell lines. The parameters D_m , m , and r of the combinations, and the mean CI values can be found in table 2. The mixture showed marked antagonistic effects at all concentrations assayed after 24 and 48 h in both cells. In the case of 48 h, the antagonist effect in more evident both in HepG2 and Caco-2 cells.

3.3. Electron microscopic observation in HepG2 cells

Electron microscopic observation was only performed in HepG2 cells since they were most sensitive cells in comparison to Caco-2 cells. HepG2 cells exposed to the extract and the mixture of stilbenes underwent a concentration-dependent antiproliferative effect. A moderate decrease in cell proliferation was observed in the exposure to the lowest concentrations assayed (7.98 $\mu\text{g/ml}$ for the extract and 7.37 $\mu\text{g/ml}$ for the mixture).

The exposure to 31.91 $\mu\text{g/ml}$ of the ST-99 extract induced not only cell cycle arrest but also death cell evidenced by the presence of apoptotic bodies. These findings were also observed in the treatment with the highest concentration of the mixture, although in less frequency.

In the ultrastructural study, control cells are characterized by big euchromatic nuclei with compact nucleoli (Fig. 6A). In the cytoplasm, cisternae from rough endoplasmic reticulum are linked to mitochondrial organelles. One of the most specific features of HepG2 cell line is the cellular interactions by zonula adherens, which define a surface coated with microvilli similar to bile ducts (Fig. 6B). These morphological features are also observed in the treatment to the lowest concentrations of the ST-99 extract (Fig. 6C and 6D). Moreover, cells showing apoptotic nuclei (Fig. 6D). Cells treated with the highest concentration of the extract (31.91 $\mu\text{g/ml}$) showed more frequently cytoplasmic projections that would turn into apoptotic bodies (arrow) (Fig. 6 F and 6G). Similarly, an increase in the number of apoptotic cells was observed (Fig. 6H).

When HepG2 cells were exposed to the lowest concentration of the mixture of stilbenes (7.37 $\mu\text{g/ml}$), they showed cytoplasmic evaginations (Fig. 7A and 7B) and apoptotic nuclei (Fig. 7C). These morphological features are also observed in cells exposed to 29.47 $\mu\text{g/ml}$ of the stilbenes mixture (Fig. 7D), where nucleoli in the segregation process of their fibrillar and granular components is also shown evidencing the onset of the transcriptional inactivity (Fig. 7E). Nevertheless, under these experimental conditions cell proliferation is still active since mitotic cell are found (Fig. 7F).

4. Discussion

New applications in the food industry for stilbenes could increase their intake making necessary a new risk assessment. In this regard, the first step would be to perform a cytotoxicity assay to establish the potential concentrations suitable for its use in the food industry. In the present work, the cytotoxic effect observed when HepG2 and Caco-2

cells were exposed to ST-99 extract and the mixture of stilbenes were similar in general. Although, in the case of Caco-2 cells exposed to the mixture, lower effect was recorded at 24 h in comparison to the exposure to ST-99 extract. Similarly, several studies using different cell cultures have shown that treatment with stilbene extracts of different human cells: HepG2 and Caco-2 cells (Medrano-Padial et al., 2019), human lung cancer A-427 and human gastric adenocarcinoma CRL-1739 (Ye et al., 1999) and breast and liver tumour cell lines (Giovannelli et al., 2014), resulted in a dose and a time-dependent inhibition of cell growth. Moreover, in our study, although EC₅₀ values for ST-99 extract and the mixture were similar, the concentration-effects curves were different. In both cell lines, ST-99 extract presented a very potent effect, while the decrease in the viability produced by the mixture was slowly progressive, especially after 24 h of exposure. The sharp curve obtained after the exposure to ST-99 could be related to the presence of different stilbenes, although some of them were only present in traces that could modulate enzymes and cell cycles having a great influence on toxicity (Xue et al., 2014). Similarly, Billard et al., (2002) also stated that the great antiproliferative effect of vineatrol® (a grapevine shoot extract containing 29% of stilbenes, mainly *trans*-resveratrol and ϵ -viniferin) is associated with the stilbenes that were in lower percentage. Moreover, in our study, the shape of the concentration-effect curve obtained after exposure ST-99 was similar to *trans*- ϵ -viniferin curve, probably because this stilbene is its main compound.

The cytotoxic effects of the mayor compounds of ST-99 extract were also evaluated. The *trans*- ϵ -viniferin alone induced comparable cytotoxic effects to those observed for ST-99 extract and the mixture of stilbenes in both cell lines. However, HepG2 and Caco-2 cells exposed to *trans*-resveratrol underwent the lowest toxic effects observed in all exposures. Although most of literature addressed the antiproliferative and pro-apoptotic effects of resveratrol by inhibiting the initiation step of tumour development (Gautam et al., 2000; Billard et al., 2002; Quiney et al., 2004; Notas et al., 2006; Müller et al., 2009;

Ha et al., 2009; Colin et al., 2008; Marel et al., 2008; Storniolo and Moreno, 2012), in recent years, the natural resveratrol oligomer *trans*- ϵ -viniferin has been shown to be even more potent than *trans*-resveratrol in reducing the proliferation in a variety of human cells (Barjot et al. 2007; Xue et al., 2014; Zghonda et al., 2011). Both compounds modulate different enzymes that have a great influence on toxicity, being likely that the potency of the effects of these two compounds may be dependent on the cell type and/or the target molecule (Zghonda et al., 2011).

The effect of single stilbenes alone is well characterized, but the toxicity of mixture of stilbenes is less studied so far. In this sense, preparations containing a mixture of polyphenols may exhibit potentiation or synergistic effects, as compared to any other polyphenol tested alone (Billard et al., 2002). Most authors have reported that the cytotoxic effect of *trans*-resveratrol is synergized by other stilbenes in a complex mixture. Recently, Balasubramani et al. (2019) indicated a synergistic activity of stilbenes present in muscarine grape extract, being at least 10-fold more effective in inducing cell death than the pure compound resveratrol in several cancer cells. Similarly, Billard et al. (2002) and Colin et al. (2008) stated that vineatrol® exhibited a greater antiproliferative effect than *trans*-resveratrol and *trans*- ϵ -viniferin on lymphocytic leukemia cells. . Despite these findings, little is known about the interactions of *trans*-resveratrol and *trans*- ϵ -viniferin together. In the present work, the isobologram analysis showed an antagonistic effect between *trans*-resveratrol and *trans*- ϵ -viniferin at all concentrations assayed after 24 h and 48 h. Similarly, Giovannelli et al. (2014) found that natural extract which had significant amount of viniferins, were in general less effective reaching from 20% to about 50% growth inhibition (HCC1500 and HCC195 cells) at the highest concentration, whereas other extract containing less viniferins contents reached inhibition above 80%. Considering these observations, although they did not study the effect of binary mixtures, the existence of interactions between dimeric and monomeric stilbenes can be the

reason of the lower inhibition observed in extract containing higher amount of stilbenes (Giovannelli et al., 2014).

Finally, the present work completes the cytotoxicity assays with a morphological study in HepG2 cells. The ultrastructural study indicates that the treatment with the extract ST-99 induces a breakdown in the cell cycle by inhibiting cell proliferation. Moreover, cell death, mainly apoptosis, is also observed, especially at the higher concentrations assayed. This effect is minimized in the treatment with the mixture of stilbenes, where the proliferative activity of the cells is conserved but the induction of programmed cell death is considerably reduced. Similarly, acetylated analogs of resveratrol as well as the mixture of polyphenolic compounds known as vineatrol® affect cell cycle progression of human colon cancer cell lines (Colin et al., 2009). Also, different preparations of vineatrol® and resveratrol induced apoptosis in leukemic B cells, with ϵ -viniferin only exhibiting slight effects (Billard et al., 2002). Studies on the multiple myeloma cell line U266 showed that ϵ -viniferin and resveratrol could regulate cell cycle by affecting different targets inducing apoptosis in a caspase-dependent manner by disrupting normal mitochondrial membrane potential (Barjot et al., 2007).

5. Conclusion

In conclusion, our results indicate a significant decrease in the viability of the human intestinal Caco-2 cells and liver HepG2 cells after exposure to ST-99 extract, *trans*- ϵ -viniferin and its mixture with *trans*-resveratrol (1:3.9) in the cytotoxicity assays, while *trans*-resveratrol presented the lower effect. In addition, the type of interaction of *trans*-resveratrol and *trans*- ϵ -viniferin was established by the isobolograms method reporting an antagonistic response. The ultra-structural alterations in HepG2 cells exposed to ST-99 extract and the mixture evidenced that the cytotoxicity previously observed was due to a breakdown in the cell cycle by inhibiting cell proliferation and induction of apoptosis. These findings are of great concern not only because they contribute to increase the

knowledge of these stilbenes but also because the ST-99 extract could be used as an alternative to SO₂ in winemaking. Considering the toxicity observed in the *in vitro* assays performed, further studies are needed in order to assess the toxicity on human and ensure its safety.

5. Acknowledgements

The authors thank the CITIUS Biology Service (University of Seville) for the technical assistance offered. Moreover, we would like to thank Dr. Gutierrez-Praena for his assistance in the isobologram study. In addition, we thank M-L. Iglesias and A. Palos-Pinto for their technical assistance.

Funding: This work was supported by the Ministerio de Economía, Industria y Competitividad and INIA for the financial support for this project (RTA2015-00005-C02-02). Moreover, it was also supported by the Bordeaux Metabolome Facility and MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010 project).

6. References

- Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Skaltsounis, A.L., & Haroutounian, S.A. (2012). Grape stem extracts Polyphenolic content and assessment of their *in vitro* antioxidant properties. *LWT- Food Science and Technology*, 48, 316-322. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.006>
- Balasubramani, S.P., Rahman, M.A., & Basha, S.M. (2019). Synergistic action of stilbenes in muscadine grape berry extract shows better cytotoxic potential against cancer cells than resveratrol alone. *Biomedicines*. 7(4), 96. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7040096>
- Baltrop, J.A., Owen, T.C., & Cory A.H. (1991). 5-((3-carboxyphenyl)-3-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 2-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenylterazolium bromide (MTT) reducing to purple water soluble formazan as cell viability indicators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1, 611.
- Barjot, C., Tournaire, M., Castagnino, C., Vigor, C., Vercauteren, J., & Rossi, J.F. (2007). Evaluation of antitumor effects of two vine stalk oligomers of resveratrol on a panel of lymphoid and myeloid cell lines: comparison with resveratrol. *Life Sciences*, 81, 23-24, 1565-1574. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.08.047>
- Baur, J.A., & Sinclair, D.A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 493-503. <https://doi.org/10.1038/nrd2060>
- Bavaresco, L., Lucini, L., Busconi, M., Flamini, R., & De Rosso, M. (2016). Wine Resveratrol: From the Ground Up. *Nutrients*, 8, 4, 222. <https://doi.org/10.3390/nu8040222>
- Biais, B., Krisa, S., Cluzet, S., Da Costa, G., Waffo-Teguo, P., Mérillon, J. M., & Richard, T. (2017). Antioxidant and Cytoprotective Activities of Grapevine Stilbenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 24, 4952-4960. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01254>
- Billard, C., Izard, J.C., Roman V., Kern C., Mathiot, C., Mentz, F., & Kolb, J.P. (2002). Comparative Antiproliferative and Apoptotic Effects of resveratrol, epsilon-viniferin and vine-shots Derived Polyphenols (Vineatrols) on Chronic B Lymphocytic Leukemia Cells and Normal Human Lymphocytes. *Leukemia & Lymphoma*, 43, 10, 1991-2002. <https://doi.org/10.1080/1042819021000015952>
- Borenfreud, E., & Puerner, J.A. (1984). A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assays. *Journal of Tissue Culture Methods*, 9, 7-9.

- Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Chou, T. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Review*, 58, 621-681. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>
- Chou, T.C., & Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, 22, 27-55. [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0065-2571(84)90007-4)
- Colin, D., Lancon, A., Delmas, D., Lizard, G., Abrossinow, J., Kahn, E., Jannin, B., & Latruffe, N. (2008). Antiproliferative activities of resveratrol and related compounds in human hepatocyte derived HepG2 cells are associated with biochemical cell disturbance revealed by fluorescence analyses. *Biochimie*, 90, 1674-1684. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.06.006>
- Colin, D., Gimazane, A., Lizard, G., Izard, J.C., Solary, E., Latruffe, N., & Delmas, D. (2009). Effects of resveratrol analogs on cell cycle progression, cell cycle associated proteins and 5fluoro-uracil sensitivity in human derived colon cancer cells. *International Journal of Cancer*, 124, 2780-2788. <https://doi.org/10.1002/ijc.24264>
- EFSA, European Food Safety Authority. (2009). Guidance on safety assessment of botanicals and botanical preparations intended for use as ingredient in food supplements. *EFSA Journal*, 7, 1249. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1249>
- EFSA, European Food Safety Authority. (2016a). Scientific Opinion on the re-evaluation of sulfur dioxide (E 220), sodium sulfite (E 221), sodium bisulfite (E 222), sodium metabisulfite (E 223), potassium metabisulfite (E 224), calcium sulfite (E 226), calcium bisulfite (E 227) and potassium bisulfite (E 228) as food additives. *EFSA Journal*, 14, 4438. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4438>
- EFSA, European Food Safety Authority. (2016b). Safety of synthetic trans-resveratrol as a novel food pursuant to Regulation (EC) No 258/97. *EFSA Journal*, 14, 14368. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4368>
- El Khawand, T.; Courtois, A., Valls, J., Richard, T., Krisa, S. (2018). A review of dietary stilbenes: sources and bioavailability. *Phytochemistry Reviews*, 17, 1007–1029. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9578-9>
- Gabaston, J., El Khawand, T., Wao-Teguo, P., Decendit, A., Richard, T., Mérillon, J.M., & Roman, P. (2018). Stilbenes from grapevine root: A promising natural

- insecticide against *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Pest Science*, 91, 897–906. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-0956-2>
- Gautam, S.C., Xu, Y.X., Dumaguin, M., Janakiraman, N., & Chapman, R.A. (2000). Resveratrol selectively inhibits leukemia cells: a prospective agent for ex vivo bone marrow purging. *Bone marrow Transplant*, 25, 639-645. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1702189>
- Giovannelli, L., Innocenti, M., Santamaria, A.R., Bigagli, E., Pasqua, G., & Mulinacci, N. (2014). Antitumoural activity of viniferin-enriched extracts from *Vitis vinifera* L. cell cultures. *Natural Product Reports*, 28, 22, 2006-2016. <http://doi.org/10.1080/14786419.2014.924935>
- Guerrero, R.F., García-Parrilla, M.C., Puertas, B., & Cantos-Villar, E. (2009). Wine, resveratrol and health: a review. *Natural Product Communications*, 4, 5, 635-658.
- Guerrero, R.F., & Cantos-Villar, E. (2015). Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review. *Trends in Food Science and Technology*, 42, 1, 44-63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2014.11.004>
- Guerrero, R.F., Biais, B., Richard, T., Puertas, B., Waffo-Teguo, P., Merillon, J.M., & Cantos-Villar, E. (2016). Grapevine cane's waste is a source of bioactive stilbenes. *Industrial Crops and Products*, 94, 884-892. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.055>
- Guerrero, R.F., Valls-Fonayet J., Richard T., & Cantos-Villar E. (2020). A rapid quantification of stilbene content in wine by ultra-high pressure liquid chromatography - Mass spectrometry. *Food Control*, 108, 106821. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106821>
- Gutiérrez-Praena, D., Guzmán-Guillén, R., Pichardo, S., Moreno F.J., Vasconcelos, V., Jos, A., & Cameán, A.M. (2019). Cytotoxic and morphological effects of microcystin-LR, cylindrospermopsin, and their combinations on the human hepatic cell line HepG2. *Environmental Toxicology*, 34, 3, 1–12. <https://doi.org/10.1002/tox.22679>
- Ha, D.T, Chen, Q.C., Hung, T.M., Youn, U.J., Ngoc, T.M., Thuong, P.T., Kim, H.J., Seong, Y.H., Min, B.S., & Bae, K. (2009). Stilbenes and Oligostilbenes from Leaf and Stem of *Vitis amurensis* and Their Cytotoxic Activity. *Archives of Pharmacal Research*, 32,2, 177-183. <http://doi.org/10.1007/s12272-009-1132-2>
- Hernandez, A.F., Buha, A., Constantin, C., Wallace, D.R., Sarigiannis, D., Neagu, M., Antonijevic, B., Hayes, A.W., Wilks, M.F., & Tsatsakis, A. (2019). Critical assessment and integration of separate lines of evidence for risk assessment of

- chemical mixtures. *Archives of Toxicology*, 93, 2741–2757.
<https://doi.org/10.1007/s00204-019-02547-x>
- Marel, A.K., Lizard, G., Izard, J.C., Latruffe, N., & Delmas, D. (2008). Inhibitory effects of trans-resveratrol analogs molecules on the proliferation and the cell cycle progression of human colon tumoral cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52, 538-548. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700185>
- Medrano-Padial, C., Puerto, M., Moreno, F.J., Richard, T., Cantos-Villar, E., & Pichardo, S. (2019). In Vitro Toxicity Assessment of Stilbene Extract for Its Potential Use as Antioxidant in the Wine Industry. *Antioxidants*, 8, 467.
<http://doi:10.3390/antiox8100467>
- Müller, C., Ullmann, K., Wilkens, A., Winterhalter, P., Toyokuni, S., & Steinberg, P. (2009). Potent Antioxidative Activity of Vineatrol®30 Grapevine-shoot Extract. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73, 8, 1831-1836.
<https://doi.org/10.1271/bbb.90213>
- Muhtadi, N. V., Hakim, E. H., Juliawaty, L. D., Syah, Y. M., Achmad, S. A., Latip, J., & Ghisalberti, E. (2006). Cytotoxic resveratrol oligomers from the tree bark of *Dipterocarpus hasseltii*. *Fitoterapia*, 77, 550-555.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.07.004>
- Nivelle, L., Aires, V., Rioult, D., Martiny, L., Tarpin, M., & Delmas, D. (2018). Molecular analysis of differential antiproliferative activity of resveratrol, epsilon viniferin and labruscol on melanoma cells and normal dermal cells. *Food and Chemical Toxicology*, 116, 323-334. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.043>
- Notas, G., Nifli, A.P., Kampa, M., Vercauteren, J., Kouroumalis, E., & Castanas, E. (2006). Resveratrol exerts its antiproliferative effect on HepG2 hepatocellular carcinoma cells, by inducing cell cycle arrest, and NOS activation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760, 1657-1666.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.09.010>
- Quiney, C., Dauzonne, D., Kern, C., Fourneron, J.D., Izard, J.C., Mohammade, R.M., Kolb, J.P., & Billard, C. (2004). Flavones and polyphenols inhibit the NO pathway during apoptosis of leukemia B-cells. *Leukemia Research*, 28, 851-861. <https://doi:10.1016/j.leukres.2003.12.003>
- Raposo, R., Ruiz-Moreno, M.J., Garde-Cerdán, T., Puertas, B., Moreno-Rojas, J.M., Gonzalo-Diago, A., Guerrero, R.F., Ortíz, V., & Cantos-Villar, E. (2016). Grapevine-shoot stilbene extract as a preservative in red wine. *Food Chemistry*, 197, 1102-1111. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.102>

- Richard, T., Poupard, P., Nassra, Marian., Papastamoulis, Y., Iglésias, M.L., Krisa, S., Waffo-Teguo, P., Mérillon, J.M., & Monti, J.P. (2011). Protective effect of epsilon-viniferin on b-amyloid peptide aggregation investigated by electrospray ionization mass spectrometry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19, 3152-3155. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.04.001>
- Ruiz-Moreno, M.J., Raposo, R., Cayuela, J.M., Zafrilla, P., Piñeiro, Z., Moreno-Rojas, J.M., Mulero, J., Puertas, B., Giron, F., Guerrero, R.F., & Cantos-Villar, E. (2015). Valorization of grape stems. *Industrial Crops and Products*, 63, 152-157. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.016>
- Storniolo, C.E., & Moreno, J.J. (2012). Resveratrol metabolites have an antiproliferative effect on intestinal epithelial cancer cells. *Food Chemistry*, 134,3, 1385-1391. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.036>
- Tatay, E., Meca, G., Font, G., & Ruiz, M.J. (2014). Interactive effects of zearalenone and its metabolites on cytotoxicity and metabolization in ovarian CHO-K1 cells. *Toxicology in Vitro*, 28, 95-103. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.06.025>
- Vion, E., Page, G., Bourdeaud, E., Paccalin, M., Guillard, J., & Bilan, A.R. (2018). Trans ϵ -viniferin is an amyloid- β disaggregating and anti-inflammatory drug in a mouse primary cellular model of Alzheimer's disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 88, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.12.003>
- Xue, Y.Q., Di, J.M., Luo, Y., Cheng, K.J., Wei, X., Shi, Z. (2014). Resveratrol Oligomers for the Prevention and Treatment of Cancers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 9. <http://doi.org/10.1155/2014/765832>
- Ye, X., Krohn, R.L., Liu, W., Joshi, S.S., Kuszynski, C.A., McGinn, T.R., Bagchi, M., Preuss, H.G., Stohs, S.J., & Bagchi, D. (1999). The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells. *Molecular & Cellular Biochemistry*, 196, 1-2, 99-108.
- Zghonda, N., Yoshida, S., Ezaki, S., Otake, Y., Murakami, C., Mliki, A., Ghorbel, A., & Miyazaki, H. (2012). ϵ -Viniferin Is More Effective Than Its Monomer Resveratrol in Improving the Functions of Vascular Endothelial Cells and the Heart. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 76:5, 954-960, <https://doi.org/10.1271/bbb.110975>

Figure legends

Figure 1. Reduction of tetrazolium salt (MTS), neutral rep uptake (NR) and total protein content (TP) of HepG2 cells exposed for 24 h (A) and 48 h (B) to 0-100 µg/mL of the stilbene extract ST-99, and exposed for 24 h (C) and 48 h (D) to 0-100 µg/mL of the stilbene mixture. All values expressed as mean ± SD. Significant differences in respect to the control from $p < 0.01$ (**).

Figure 2. Reduction of tetrazolium salt (MTS), neutral rep uptake (NR) and total protein content (TP) of HepG-2 cells exposed for 24 h (A) and 48 h (B) to 0-100 µg/mL of trans- ϵ -viniferin, and exposed for 24 h (C) and 48 h (D) to 0-50 µg/mL of trans-resveratrol. All values expressed as mean ± SD. Significant differences in respect to the control from $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**).

Figure 3. Reduction of tetrazolium salt (MTS), neutral rep uptake (NR) and total protein content (TP) of Caco-2 cells exposed for 24 h (A) and 48 h (B) to 0-100 µg/mL of the stilbene extract ST-99, and exposed for 24 h (C) and 48 h (D) to 0-100 µg/mL of the stilbene mixture. All values expressed as mean ± SD. Significant differences in respect to the control from $p < 0.01$ (**).

Figure 4. Reduction of tetrazolium salt (MTS), neutral rep uptake (NR) and total protein content (TP) of Caco-2 cells exposed for 24 h (A) and 48 h (B) to 0-100 µg/mL of trans- ϵ -viniferin, and exposed for 24 h (C) and 48 h (D) to 0-50 µg/mL of trans-resveratrol. All values expressed as mean ± SD. Significant differences in respect to the control from $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**).

Figure 5. Combination index (CI)/fraction affected (fa) curve in HepG2 cells exposed to a binary mixture of trans- ϵ -viniferin and trans-resveratrol for 24 h (A) and 48 h (B), and in Caco-2 cells exposed to the same mixture for 24 h (C) and 48 h (D). Each point represents the $CI \pm$ s.d. at a fractional effect. The dotted line ($CI = 1$) indicates additivity, the area under the dotted line synergy, and the area above the dotted line antagonism.

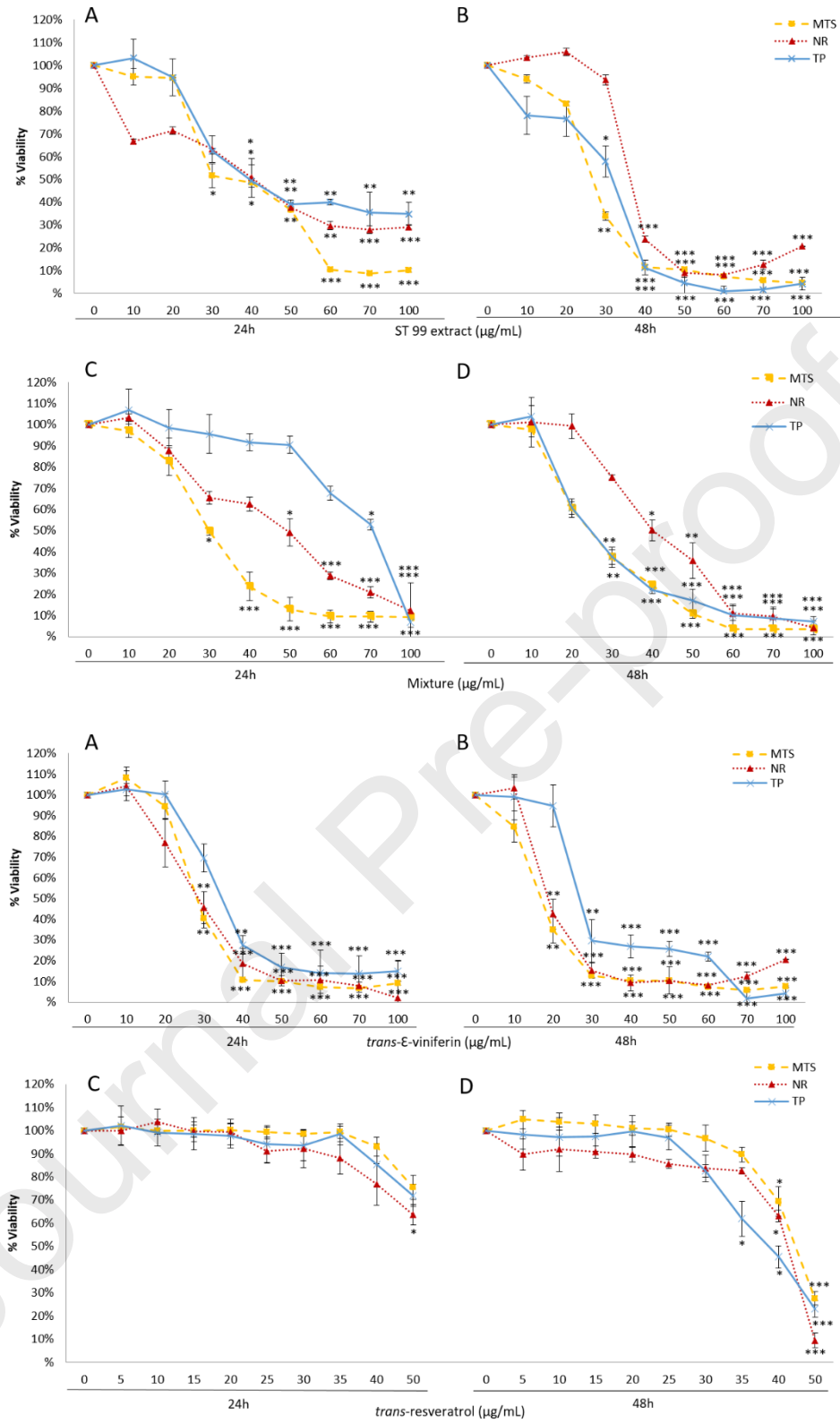
Figure 6. Morphology of HepG2 cells exposed to 31.91, 15.95, and 7.98 $\mu\text{g/ml}$ of the extract ST-99 after 24 h. Control HepG2 cells in normal growth with normal morphology showing big euchromatic nuclei (N) with compact nucleoli (n) (A). Cell treated with 7.98 $\mu\text{g/ml}$ of ST-99 developed cisternae from rough endoplasmic reticulum (rer) linked to mitochondrial organelles (m) (B). Cellular interactions (arrow head) with microvilli (arrow) are also observed (C). Cells showed cellular interactions (arrow) (D) and apoptotic nuclei (ApN) (E). Cells exposed to 31.91 $\mu\text{g/ml}$ showed cytoplasmic projections that would turn into apoptotic bodies (arrow) (F). Big lipid drops are also shown (Lip) (G). Increase in the number of apoptotic cells (ApN) (H).

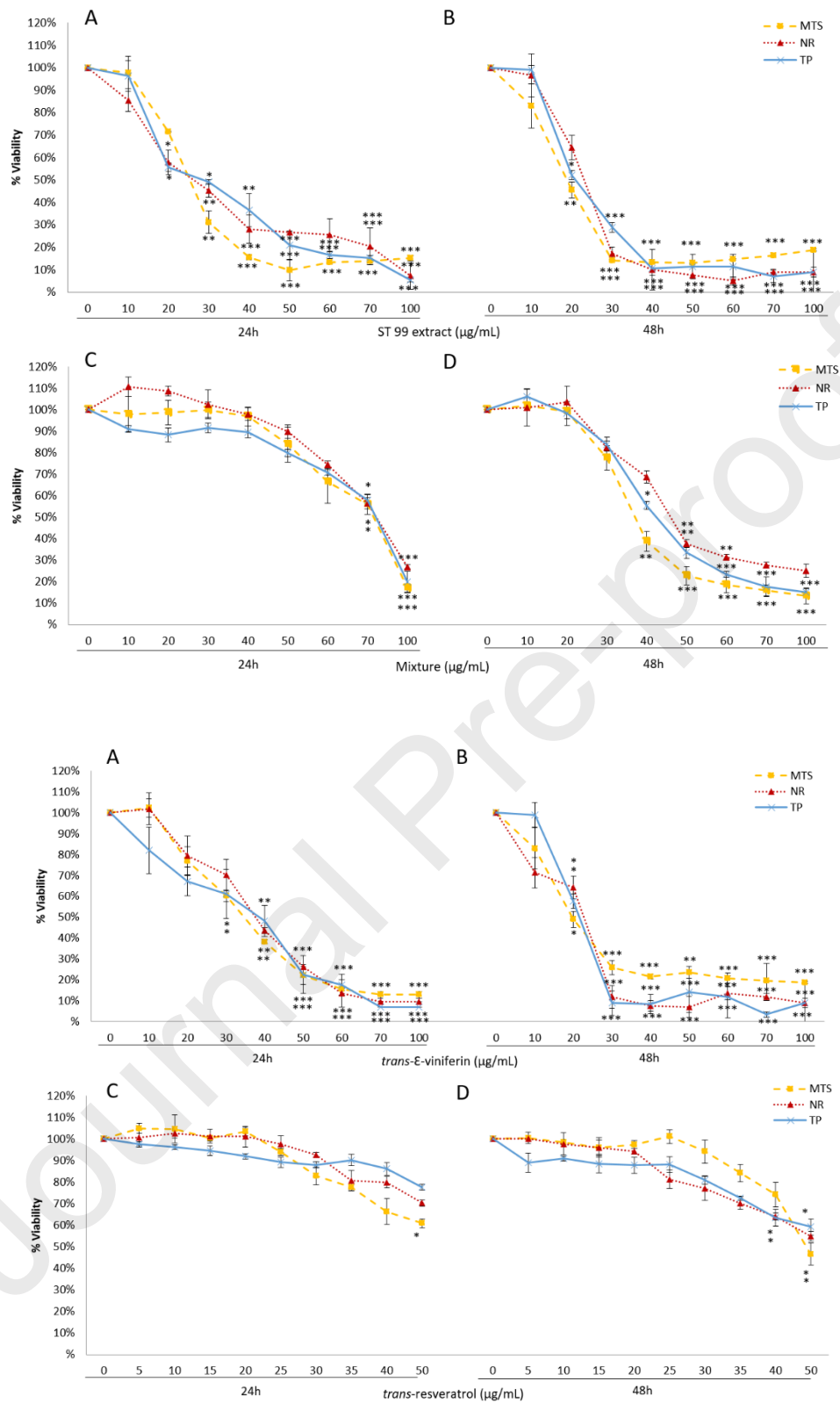
Figure 7. Morphology of HepG2 cells exposed to 29.47 (A, B, C) and 7.37 $\mu\text{g/ml}$ of the mixture of stilbenes (D, E, F). HepG2 cells exposed to 7.37 $\mu\text{g/ml}$ of the mixture of stilbenes showed cytoplasmic evaginations (arrow) (A, B) and apoptotic nuclei (ApN) (C). HepG2 treated with 29.47 $\mu\text{g/ml}$ of the stilbenes mixture also showed apoptotic nuclei (ApN) and lipid drops (Lip) (D). At this concentration, the nucleoli (n) was in segregation process of their fibrillar (f) and granular (g) components (E). However, cell proliferation is still observed in mitotic process (Mit) (F).

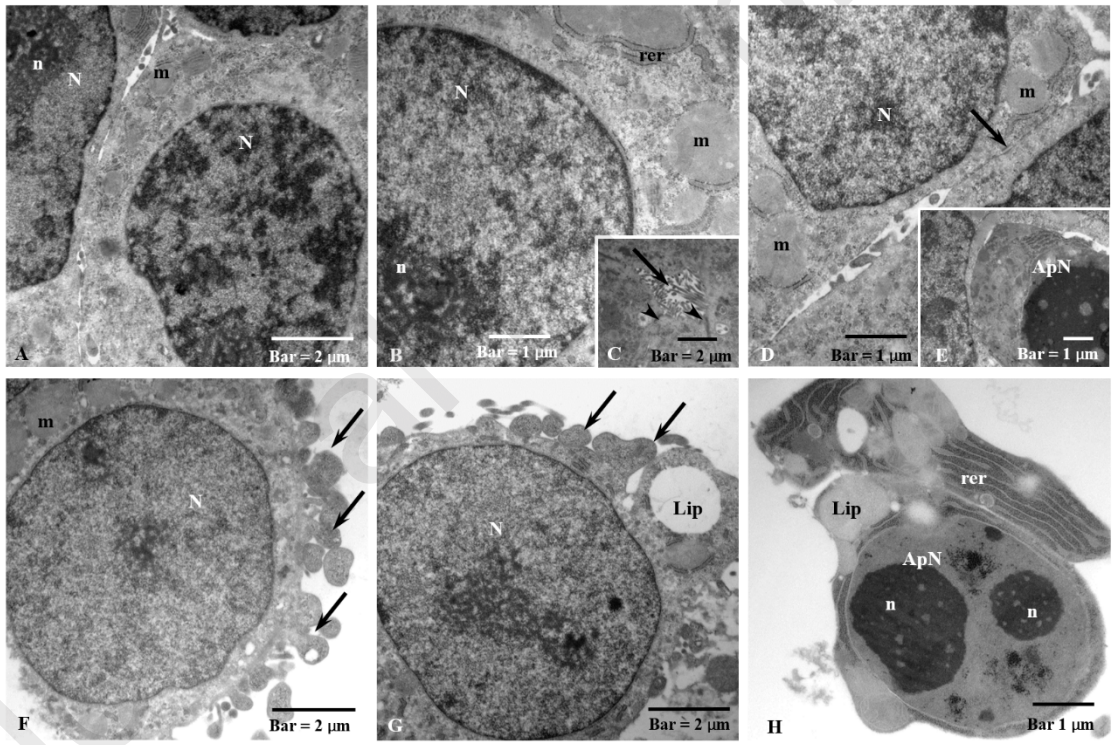
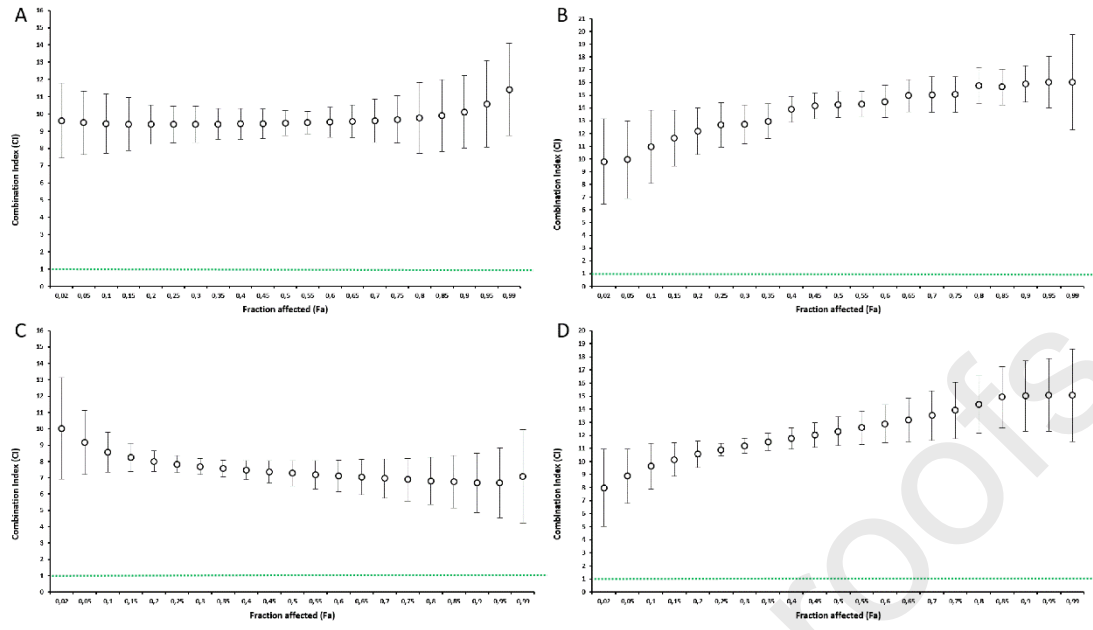
Table legend

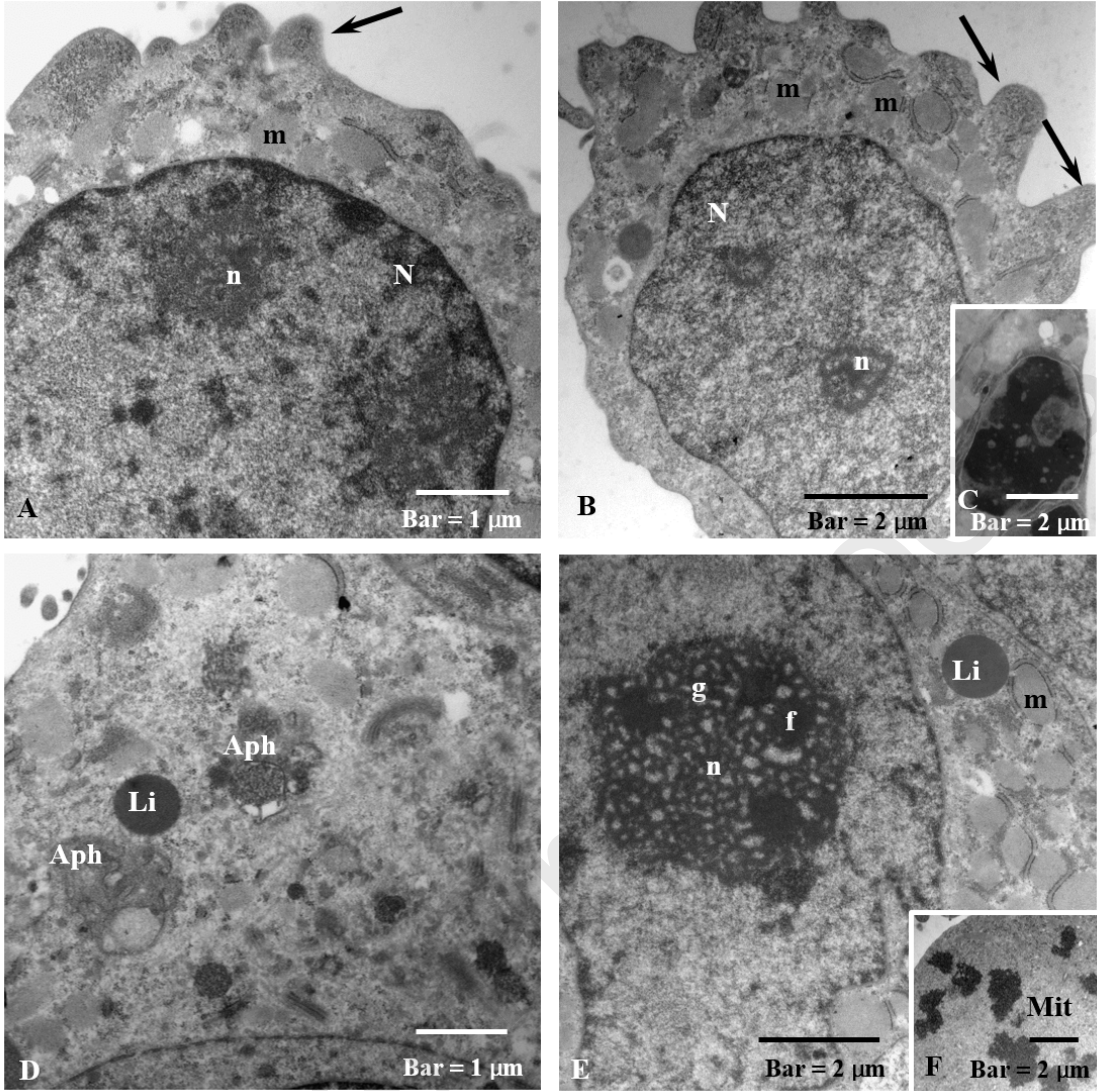
Table 1. Cytotoxicity of the stilbenes extract, *trans*- ϵ -viniferin, *trans*-resveratrol and its mixture on the selected biomarkers according to EC_{50} values ($\mu\text{g/ml}$).

Table 2. The parameter m , D_m and r are the antilog of x-intercept, the slope and the linear correlation coefficient of the median-effect plot, which signifies the shape of the dose-effect curve, the potency (IC_{50}), and the conformity of the data to the mass-action law, respectively.





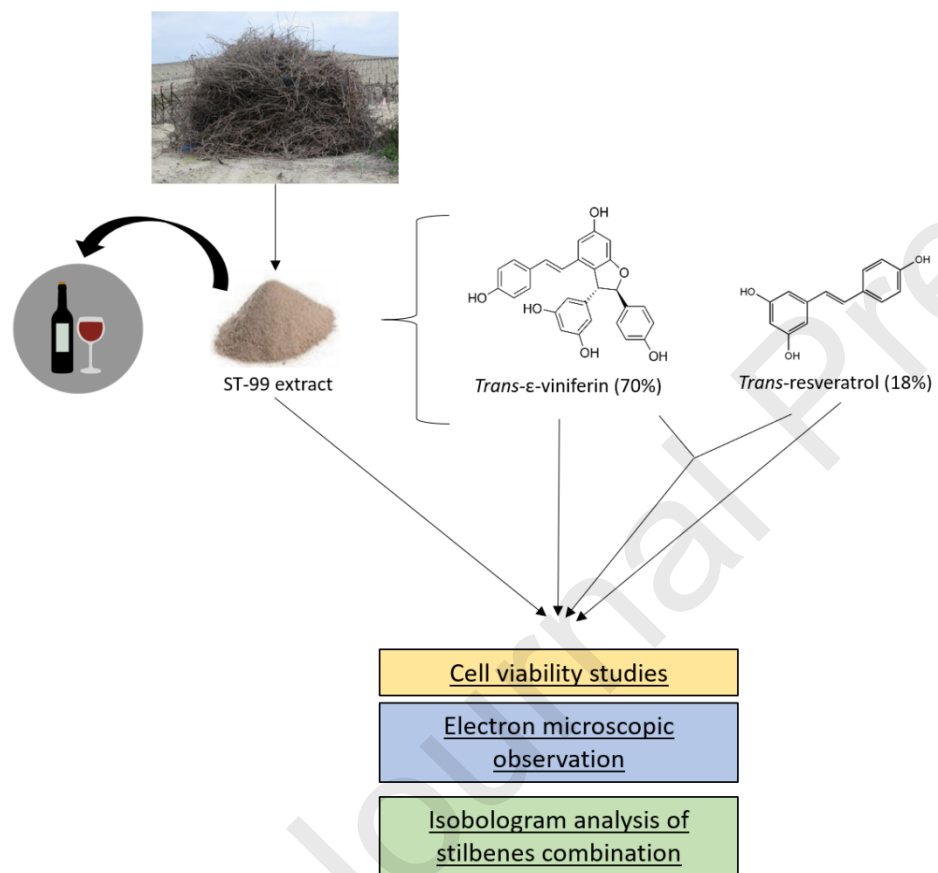




Tested compounds	EC ₅₀ HepG2 (µg/mL)	EC ₅₀ Caco-2 (µg/mL)	Time of exposure
ST-99 extract	31.91 ± 1.55	27.79 ± 2.35	24h
	26.58 ± 2.00	19.29 ± 1.02	48h
Mixture	29.47 ± 3.54	74.34 ± 2.40	24h
	26.57 ± 1.92	38.67 ± 2.02	48h
<i>Trans-ε</i> -viniferin	28.28 ± 2.15	36.72 ± 3.01	24h
	17.85 ± 3.03	20.63 ± 1.25	48h
<i>Trans</i> -resveratrol	>50	>50	24h
	39.56 ± 2.41	48.89 ± 2.99	48h

Stilbene	HepG2				Caco-2			
	Time	D _m (µg/mL)	<i>m</i>	<i>r</i>	Time	D _m (µg/mL)	<i>m</i>	<i>r</i>
<i>trans</i> -resveratrol	24h	49.09	0.98	0.98	24h	64.70	1.90	0.99
	48h	58.49	2.00	0.99	48h	90.19	1.38	0.96
<i>trans</i> - ϵ -viniferin	24h	39.51	1.60	0.96	24h	39.29	1.10	0.99
	48h	17.84	1.44	1.00	48h	23.30	1.39	0.99
Mixture	24h	59.72	1.00	0.99	24h	61.99	1.26	0.99
	48h	60.80	1.22	0.97	48h	67.35	1.20	0.99

Graphical abstract



Journal Pre-proofs

Highlights

- Stilbenes (ST-99, the mixture and trans- ϵ -viniferin) induced cytotoxic effects in both cells.
- trans-resveratrol underwent the lowest toxic effects.
- Inhibiting cell proliferation and induction of apoptosis were observed in HepG2.
- The mixture of major stilbenes showed antagonistic effects by isobologram analysis.

Author Contributions:

Concepción Medrano-Padial: formal analysis, investigation, methodology, writing-original draft and writing—review & editing.

María Puerto: investigation, methodology, supervision, writing-original draft and writing—review & editing

María del Mar Merchán-Gragero: formal analysis, investigation and methodology.

F. Javier Moreno: investigation, methodology and writing-original draft

Tristan Richard: formal analysis, investigation, methodology, resources and writing—review & editing.

Emma Cantos-Villar: formal analysis, funding acquisition, project administration, resources and writing—review & editing.

Silvia Pichardo: funding acquisition, project administration, supervision, writing-original draft and writing—review & editing.

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

None

CAPÍTULO 4 / CHAPTER 4

Concepción Medrano-Padial, María Puerto,
Tristan Richard, Emma Cantos-Villar, Silvia Pichardo.

PROTECTION AND REVERSION ROLE OF
A PURE STILBENE EXTRACT FROM GRAPEVINE SHOOT
AND ITS MAJOR COMPOUNDS
AGAINST AN INDUCED OXIDATIVE STRESS.

Journal of Functional Foods (en revision / under revision), 2020.

CAPÍTULO 5 / CHAPTER 5

**Concepción Medrano-Padial, Ana Isabel Prieto,
María Puerto, Silvia Pichardo.**

**MUTAGENIC AND GENOTOXIC POTENTIAL ASSESSMENT
OF A PURE STILBENE EXTRACT BY *IN VITRO* STUDIES.**

Food and Chemical Toxicology (en revision / under revision), 2021.

CAPÍTULO 6 / CHAPTER 6

**Concepción Medrano-Padial, María Puerto,
Ana Isabel Prieto, Nahúm Ayala, Pauline Beaumont,
Stéphanie Krisa, Silvia Pichardo.**

IN VIVO GENOTOXICITY OF STILBENE EXTRACT INTENDED TO BE USED
AS NATURAL ADDITIVE: A COMBINATION OF THE MICRONUCLEUS TEST
AND THE COMET ASSAY.

Título provisional / Provisional title.

VI. DISCUSIÓN GENERAL

GENERAL DISCUSSION

El SO₂ es el conservante tradicionalmente utilizado en la industria vitivinícola con el fin de controlar de manera eficiente la estabilidad microbiana y oxidativa de los vinos. Recientemente, el Panel de Aditivos Alimentarios y Fuentes de Nutrientes añadidos a los alimentos (ANS) de la EFSA, ha pronunciado un dictamen científico sobre la re-evaluación de los aditivos del grupo anhídrido sulfuroso y sulfitos cuando se utilizan como aditivos alimentarios. En él se concluye que, en la actualidad, la exposición del consumidor a sulfitos está por encima de la Ingesta Diaria Admisible en todos los grupos de población (EFSA, 2016). Dada la toxicidad y las implicaciones negativas que el SO₂ tiene sobre la salud de los consumidores, es de gran interés la búsqueda de alternativas innovadoras que sean seguras para la salud de los consumidores y que estén encaminadas hacia el reemplazo o disminución del sulfuroso, todo ello sin comprometer la calidad del vino.

A todas estas consideraciones debemos añadir que, la demanda de los consumidores cambia con notable rapidez en el sector de los vinos. Actualmente, el interés de los consumidores por aspectos relacionados con la salud y el medio ambiente hace que la tendencia a consumir vinos con menor cantidad de aditivos esté en auge (Costanigro y cols., 2014).

Por otro lado, en el informe emitido por la OIV, presentado en París en abril de 2018, se indica que en el mundo se generando entre 3 y 5 toneladas por hectárea de viñedo de subproductos procedentes de madera de poda. En este momento, esta madera se utiliza para compost y su valor añadido es muy bajo. Sin embargo, estos subproductos son una importante fuente de compuestos bioactivos de naturaleza polifenólica destacando los estilbenos, los cuales han demostrado una alta capacidad antioxidante y antimicrobiana.

En la presente tesis doctoral se ha evaluado el perfil toxicológico de dos extractos procedentes de los subproductos de la industria del vino, uno con una riqueza del 45.5% y otro con una riqueza del 99% (ST-99), así como de sus estilbenos mayoritarios, *trans-ε*-viniferina y *trans*-resveratrol, y de su mezcla en la misma proporción encontrada en el extracto de mayor riqueza (1:3.9). Estos extractos fueron obtenidos y caracterizados por el grupo de la Dra. Emma Cantos- Villar del Instituto de Formación e Investigación Agraria y Pesquera (IFAPA) dentro de un proyecto coordinado en el que se engloba la presente tesis.

En primer lugar, recopilamos información sobre los ensayos de toxicidad realizados en estilbenos. El *trans*-resveratrol es el más estudiado y, por ello, muchos autores han resumido sus propiedades (Shaito y cols., 2020; Tian y Liu, 2020) y, además, la EFSA ha realizado una amplia evaluación de su seguridad (EFSA, 2016). Por lo tanto, nos pareció más interesante realizar una revisión de los ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad *in*

vitro e *in vivo* de otros estilbenos también interesantes para la industria alimentaria: piceatanol, pterostilbeno y ϵ -viniferina. El estudio de la bibliografía mostró que estos compuestos ejercen un importante efecto citotóxico en líneas celulares cancerígenas y no cancerígenas. La intensidad de este efecto depende de las líneas celulares utilizadas, el ensayo realizado y las condiciones de exposición. Por otro lado, el daño del ADN inducido por estos compuestos ha sido demostrado como uno de sus mecanismos de citotoxicidad. Sin embargo, el potencial genotóxico *in vitro* del piceatanol, el pterostilbeno y la ϵ -viniferina se ha estudiado poco y no se han realizado estudios siguiendo las directrices de la EFSA. La mayor brecha en la evaluación de la toxicidad de estos compuestos es la falta de estudios *in vivo*, ya que la mayoría de los autores han evaluado sus propiedades beneficiosas, pero no se han realizado ensayos que evalúen su toxicidad *in vivo*. En este sentido, es de interés la evaluación toxicológica de los estilbenos y los extractos que los contienen para garantizar su seguridad, ya que no existen muchos estudios que valoren sus efectos.

En la presente tesis doctoral, los primeros estudios realizados han sido los ensayos de citotoxicidad ya que nos permiten definir la toxicidad basal de las sustancias y seleccionar un rango de concentraciones adecuado para su uso y para los ensayos de genotoxicidad. Las células utilizadas fueron líneas celulares cancerígenas del sistema digestivo, Caco-2 y HepG2, ya que la vía oral es la vía de exposición principal a los aditivos alimentarios. Además, se escogieron este tipo de células porque son más sensibles y necesitan concentraciones más bajas que las células no cancerígenas para observar muerte celular (Billard y cols., 2002; Colin y cols., 2009). Los biomarcadores utilizados fueron la captación del rojo neutro (RN), la reducción de la sal MTS (MTS) y el contenido proteico total (PT). En cuanto a las concentraciones de exposición, éstas se eligieron según la concentración a incorporar en el vino (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Sin embargo, en el caso del *trans*-resveratrol, la concentración máxima utilizada fue de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ debido a que fue la concentración más alta que mostró una adecuada solubilidad y se encuentra en el rango de concentración de este compuesto que llegaría al consumidor.

La citotoxicidad de los estilbenos ha sido evaluada en diferentes líneas celulares (Doan y cols., 2019; Makong y cols., 2019; Mizuno y cols., 2017; Yousef y cols., 2017). Estos compuestos modulan diferentes moléculas relacionadas con la toxicidad, como son las ciclooxigenasas, lipooxigenasas, diversas quinasas, factores de transcripción, citoquinas, ADN polimerasa, adenilil ciclasa, ribonucleótido reductasa, aromatasa y otras (Kuršvietienė y cols., 2016).

El efecto citotóxico del *trans*-resveratrol ha sido ampliamente estudiado. Varios autores han demostrado que este compuesto disminuye la viabilidad celular en células HepG2 (Colin y cols., 2008; Mizuno y cols., 2017; Su y cols., 2013), la línea de

adenocarcinoma de colon Caco-2 (Iwuchukwu y cols., 2011), en células de cáncer de mama MCF-7 (Thomas y cols., 2016), neuronales (Aggarwal y cols., 2004; Lantto y cols., 2009), en células de cuello de útero HeLa (Li y cols., 2008) y en células de cáncer de pulmón (Yousef y cols., 2017). Sin embargo, los resultados obtenidos en la presente tesis indican que el *trans*-resveratrol no produce una disminución mayor al 50% de la viabilidad en ninguna de las dos líneas celulares ensayadas (HepG2 y Caco-2). Tan sólo a las concentraciones más altas estudiadas (35-50 µg/mL) y tras 48 h de exposición, se observó una reducción significativa de la viabilidad celular en los tres biomarcadores estudiados.

Por otro lado, la *trans*-ε-viniferina produjo en nuestro estudio una reducción significativa de la viabilidad de las células HepG2 a partir de 30 µg/mL después de 24 h de exposición, y desde 20 µg/mL tras 48 h. Además, cuando las Caco-2 fueron expuestas a este compuesto también se pudo observar una disminución en los biomarcadores estudiados. En estas células, los resultados fueron significativos tras 24 h de exposición a partir 30 µg/mL en el ensayo MTS y PT y desde 40 µg/mL en el RN. Mientras tras 48 h, *trans*-ε-viniferina redujo la viabilidad celular a 20 µg/mL. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por otros autores que indican que la *trans*-ε-viniferina ejerce un efecto citotóxico en células cancerígenas como en la línea celular de hígado HepG2 (Rohaiza y cols., 2011), de glioma C6 (Özdemir y cols., 2018), de útero HeLa y de pecho MCF-7 (Kim y cols., 2002), inhibiendo su crecimiento a concentraciones de 74.3, 18.4, 20.4 y 44.8 µg/mL, respectivamente.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral muestran que la *trans*-ε-viniferina es más citotóxica que el *trans*-resveratrol. Esta conclusión también fue obtenida por Xue y cols., 2014 quienes indican que el dímero presenta un efecto más potente en células HepG2, HeLa y MCF-7 que el resveratrol. Sin embargo, otros autores afirman lo contrario en células cancerígenas hepáticas (Aja y cols., 2020; Colin y cols., 2008). Así, recientemente, con el fin de evaluar y comparar el potencial citotóxico de una amplia gama de dímeros y tetrámeros del resveratrol extraídos y purificados de *Vitis Vinifera* se llevó a cabo un estudio en diferentes células de hepatoma (HepG2 y Hep3B) (Aja y cols., 2020). Estos autores concluyeron que los efectos citotóxicos de los estilbenos varían de un compuesto a otro y parecen depender del modelo celular utilizado y el parámetro de estudio (Aja y cols., 2020; Zghonda y cols., 2012).

Por otro lado, aunque se conoce el efecto citotóxico de los estilbenos de manera individual, este efecto podría variar cuando estos compuestos se encuentran en combinación. En este sentido, un extracto de brotes de vid que contiene resveratrol y ε-viniferina mayoritariamente, seguido de ampelopsina A, hopeaphenol, iso-*trans*-ε-

viniferina, vitisin A, vitisin B, piceatanol y miyabenol C, llamado Vineatrol®, ha mostrado un efecto antiproliferativo *in vitro* más potente que el resveratrol *per se* en varias células cancerígenas (Billard y cols., 2002; Colin y cols., 2008; Marel y cols., 2008). Por lo tanto, la presencia concomitante de diferentes estilbenos y otras sustancias puede modular la respuesta individual. En la presente tesis, se ha llevado a cabo una evaluación de la citotoxicidad de los dos extractos ricos en estilbenos obtenidos de la madera de poda de la vid en HepG2 y Caco-2. El extracto con una riqueza del 45.5% de estilbenos mostró una reducción en la viabilidad celular desde 40 µg/mL después de 24 h de exposición, y desde 30 µg/ml tras 48 h en ambas líneas celulares. Resultados similares se obtuvieron en el caso del segundo extracto, el ST-99, el cual causó una reducción significativa a partir de 30 µg/mL en ambas líneas celulares tanto a 24 h como 48 h de exposición. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores quienes evaluaron el efecto de diferentes extractos ricos en estilbenos en células de cáncer de pecho (MCF-7) e hígado (HepG2) (Giovannelli y cols., 2014) y de próstata (PC3) (Mermariani y cols., 2015).

Como podemos observar, los resultados obtenidos en los dos extractos son similares y, a su vez, son parecidos a los obtenidos con *trans-ε*-viniferina de manera individual. Además, la curva concentración-efecto obtenida tras la exposición a ST-99 fue similar a la de la *trans-ε*-viniferina. Estos resultados nos llevan a pensar que el efecto citotóxico de los extractos viene determinado por el dímero, ya que es el estilbeno que se encuentra en mayor porcentaje en ambos extractos. Sin embargo, Billard y cols. (2002) indicaron que el efecto antiproliferativo del Vineatrol®, que contiene mayoritariamente *trans*-resveratrol y *ε*-viniferina, está asociado a los estilbenos que están en menor porcentaje. En este sentido, consideramos interesante evaluar la citotoxicidad y las interacciones en una mezcla binaria de *trans-ε*-viniferina y *trans*-resveratrol con una ratio de 3.9:1, que es como se encuentran en el extracto ST-99. Nuestros resultados indican que después de 24 h de exposición en HepG2, se observaron cambios significativos en la viabilidad celular desde 30 µg/mL, 50 µg/mL y 70 µg/mL con los ensayos de MTS, RN y PT respectivamente. Tras 48 h, los resultados fueron similares, siendo significativos a partir de 30 µg/mL. Por otro lado, en las células Caco-2, sólo tras la exposición de 70 µg/mL de la mezcla tras 24 h se redujo la viabilidad significativamente en todos los biomarcadores estudiados, mientras que tras 48 h esta disminución se evidenció desde 40 µg/mL en los ensayos de MTS y PT y desde 50 µg/mL en RN. Además, con el fin de determinar las interacciones entre estos dos estilbenos se estudió su combinación mediante un análisis de isobogramas, evidenciándose que existe una interacción antagónica. En contraposición a nuestros resultados, muchos autores indican que entre los estilbenos se produce mayoritariamente sinergia (Balasubramani y cols., 2019). Sin embargo, se ha descrito que el tipo de interacción entre estos compuestos

depende del porcentaje que existe de *trans*-resveratrol respecto a los estilbenos totales y de la ratio entre estilbenos diméricos y monoméricos (Giovannelli y cols., 2014).

Por otro lado, los estilbenos han demostrado causar apoptosis en muchas células cancerígenas (Aja y cols., 2020; Chatterjee y cols., 2019), sin embargo, el mecanismo no está del todo dilucidado ya que actúan a diferentes niveles celulares. Por ello, en la presente tesis doctoral se ha llevado a cabo un estudio morfológico de ambos extractos y de la mezcla de *trans*- ϵ -viniferina y *trans*-resveratrol. En primer lugar, se observaron las células HepG2 y Caco-2 expuestas al extracto de menor riqueza en estilbenos con el microscopio óptico y electrónico. Ambas líneas celulares presentaron grandes vacuolas de lípidos, núcleos apoptóticos y aberraciones mitóticas. Además, se determinó que el daño producido en las células de carcinoma de colon fue más difuso que el obtenido en las células hepáticas, por lo que la línea celular HepG2 fue la elegida para el estudio de ST-99 y de la mezcla de estilbenos. El estudio ultraestructural indica que el tratamiento con el extracto ST-99 produce apoptosis y una inhibición de la proliferación celular con núcleos apoptóticos. Este efecto se minimiza con la mezcla de estilbenos, donde se conserva la actividad proliferativa de las células, aunque presentan evaginaciones del citoplasma y algunos cuerpos apoptóticos. De manera similar, algunos análogos acetilados del resveratrol, así como la mezcla de compuestos polifenólicos conocidos como Vineatrol®, afectan la progresión del ciclo celular de las líneas celulares de cáncer de colon humano (Colin y cols., 2009). Este efecto también se ha demostrado en células de cáncer de próstata expuestas a *r*-viniferina, un tetrámero del resveratrol (Empl y cols., 2015). Otros estudios sobre la línea celular de mieloma múltiple U266 mostraron que la ϵ -viniferina y el resveratrol regulan el ciclo celular al afectar a diferentes moléculas que inducen la apoptosis de una manera dependiente de la caspasa al interrumpir el potencial de la membrana mitocondrial normal (Barjot y cols., 2007). Además, diferentes preparaciones de Vineatrol® y resveratrol indujeron apoptosis en células B leucémicas mientras que la ϵ -viniferina solo mostró efectos leves (Billard y cols., 2002). Estos autores indicaron además que los efectos obtenidos tras la exposición a los extractos fueron más pronunciados que con los compuestos individuales, probablemente debido a la interacción de todos los polifenoles presentes en la mezcla (Billard y cols., 2002).

Otro aspecto destacable de los polifenoles es la interesante correlación que existe entre la actividad antioxidante y prooxidante y la citotoxicidad de los polifenoles (Alarcón de la Lastra y Villegas, 2007; Zheng y cols., 2006). En este sentido, considerando los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad, se llevó a cabo el estudio de los mecanismos de acción tóxica de estos compuestos mediante una evaluación *in vitro* del estrés oxidativo. Para ello, se recomienda utilizar al menos dos métodos diferentes (Schleiser y cols., 2002), por lo que analizamos la producción de ERO y las modificaciones

en el contenido de GSH en las células HepG2 y Caco-2, métodos ya usados con éxito en la evaluación de otros compuestos utilizados como antioxidantes en la industria alimentaria (Llana-Ruiz-Cabello y cols., 2015; Maisanaba y cols., 2018). Las concentraciones de exposición utilizadas fueron seleccionadas basándonos en la EC_{50} obtenida para cada compuesto y línea celular (EC_{50} , $EC_{50}/2$ y $EC_{50}/4$).

La principal propiedad de los estilbenos es su actividad antioxidante. Son muchos los estudios que han demostrado que disminuyen los radicales libres capturando ERO, como O_2 o H_2O_2 , (Arús y cols., 2017; Fenercioglu y cols., 2010; Gambini y cols., 2015; Rauf y cols., 2017; Reinisalo y cols., 2015), modulando enzimas generadoras de ERO y enzimas antioxidantes endógenas (Du y cols. 2018; Reinisalo y cols., 2015; Treml y cols., 2019). En este sentido, se sabe que los efectos antioxidantes del *trans*-resveratrol están mediados por las enzimas como superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa o catalasa (Arús y cols., 2017; Bobermin y cols., 2018; Quincozes-Santos y cols., 2013; Rubiolo y cols., 2008) por la vía de las quinasas reguladas por señales extracelulares (Cheng y cols., 2012). Sin embargo, en la presente tesis, cuando las células se expusieron a *trans*-resveratrol no hubo ningún cambio en el contenido de ROS y GSH en ninguna de células, concentraciones y tiempos de exposición ensayados. La explicación a este hecho puede ser que el potencial antioxidante de los polifenoles es diferente dependiendo del tipo de célula evaluada, la concentración utilizada y parámetro evaluado (Goutzourelas y cols., 2014; Heo y cols., 2018). De hecho, de manera general, en nuestro ensayo la línea celular Caco-2 fue más sensible a los cambios en las ERO, mientras que las células hepáticas HepG2 respondieron mejor ante el contenido de GSH. Por otro lado, la *trans*- ϵ -viniferina produjo una disminución de ERO en ambas líneas celulares, probablemente debido a que este estilbeno presenta marcadas actividades de captación de radicales libres (Zhang y cols., 2020). El contenido de GSH, además, aumentó en presencia de este compuesto. El GSH es el principal antioxidante endógeno y es responsable del mantenimiento del equilibrio redox intracelular, la desintoxicación de xenobióticos y especies reactivas de oxígeno (Schafer y Buettner, 2001), por lo que una elevación de sus niveles intracelulares indica una mejora en la protección celular contra intermediarios reactivos. El aumento, en este caso, se puede deber a la expresión de las enzimas asociadas al GSH, como la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa cuya actividad es modulada por los estilbenos (Reinisalo y cols., 2015).

La actividad antioxidante o prooxidante de los estilbenos está condicionada por la presencia de otros polifenoles (Goutzourelas y cols., 2015). Por ello, ha sido interesante estudiar la capacidad antioxidante o prooxidante de nuestros dos extractos y la combinación de *trans*- ϵ -viniferina y resveratrol. Los resultados obtenidos en los tres casos fueron muy similares dando lugar a una reducción de ROS y aumento de GSH en ambas

líneas celulares, siendo muy parecidos a los obtenidos por otros autores (Goutzourelas y cols., 2015; Müller y cols., 2009). De manera similar, un extracto con alto contenido en polifenoles ha demostrado producir una disminución significativa en los niveles de ERO en células musculares C2C12 (Goutzourelas y cols., 2015). Además, Vineatrol® también actúa como un potente antioxidante reduciendo el contenido de radicales libres y mejorando la actividad de glutatión peroxidasa en células de fibroblasto de pulmón de hámster chino V79 (Müller y cols., 2009). Existen varios estudios que indican que la actividad antioxidante de los extractos naturales depende de su contenido en polifenoles (Anastasiadi y cols., 2012; Doshi y cols., 2015). En este sentido, Benmeziame (2017) comparó la actividad antioxidante de extractos obtenidos de diferentes variedades de uva mediante su capacidad para captar H_2O_2 . Estos autores concluyeron que la variedad Gros noir de uva, que presentaba el mayor contenido de polifenoles de entre otras cinco variedades, mostró una captación de H_2O_2 más potente que los demás extractos ensayados. Nuestros resultados reafirman esta idea, puesto que el efecto antioxidante del extracto ST-99 fue superior al exhibido por el de menor riqueza.

Con el fin de dilucidar el mecanismo detrás de su actividad antioxidante, diferentes autores han demostrado que los estilbenos protegen a las células frente el daño oxidativo mediante la donación de un electrón al H_2O_2 reduciéndolo a agua (Benmeziame, 2017; Gambini y cols., 2015; Rauf y cols., 2017). En este sentido, en la presente tesis doctoral hemos evaluado la habilidad de los estilbenos de forma individual y combinados y de ambos extractos para proteger frente al daño oxidativo producido por H_2O_2 en las células HepG2 y Caco-2 midiendo el contenido en ERO y GSH. Nuestros resultados indican que el *trans*-resveratrol tan sólo fue capaz de proteger a las células a las concentraciones más altas ensayadas tras 48 h de exposición, mientras que, por otro lado, la *trans-ε*-viniferina protegió eficazmente a ambas líneas celulares del daño oxidativo a todas las concentraciones ensayadas. Estos resultados también han sido obtenidos por otros autores que han demostrado que la *trans-ε*-viniferina es un antioxidante más potente que el *trans*-resveratrol (Zghonda y cols., 2011, 2012). Esta diferencia a la hora de proteger frente a un daño oxidativo entre estos dos compuestos puede ser debida a su estructura (Cai y cols., 2004; Murias y cols., 2005; Ovesná y cols., 2006). En ese sentido, el número de grupos fenólicos y la presencia de otros grupos funcionales, como los dobles enlaces y su conjugación con grupos OH y grupos cetónicos, juegan un papel importante en la actividad antioxidante (Benmeziame, 2017).

La actividad protectora de extractos naturales frente al daño oxidativo ha sido estudiada por algunos autores. En 2017, Benmeziame (2017) evaluó diferentes extractos de uva mediante su capacidad para reducir el H_2O_2 , concluyendo que todos disminuían la

concentración del oxidante en mayor o menor medida, siendo el único factor determinante el contenido en total en polifenoles y flavonoides. Estos resultados son parecidos a los obtenidos en otros dos extractos procedentes en uva (Baydar y cols., 2007). De manera similar, en nuestro caso, ambos extractos y la mezcla de *trans-ε*-viniferina y resveratrol protegieron a las células del daño producido por H₂O₂, aunque el extracto ST-99 lo hizo de manera más pronunciada, llegando incluso a restablecer el contenido de ROS y GSH a niveles basales.

Por otro lado, también se ha evaluado la capacidad de estos compuestos para revertir el daño producido por H₂O₂. Los datos sobre estos ensayos son muy escasos, ya que la mayoría de los autores abordan la capacidad de protección de los estilbenos. Sin embargo, son muy interesantes ya que, si los mecanismos de reparación no eliminan el daño oxidativo producido, pueden producirse consecuencias perjudiciales para las células (Kowalczyk y cols., 2009). Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral indican que después de la exposición a H₂O₂, la *trans-ε*-viniferina, su mezcla con *trans*-resveratrol y los extractos redujeron el contenido de ROS a niveles basales, siendo la mezcla la más potente de todos. En relación con los niveles de GSH, la *trans-ε*-viniferina en HepG2 y los dos extractos de estilbenos en ambas líneas celulares a todas las concentraciones estudiadas mostraron comportamientos de reversión importantes. En este sentido, al comparar ambos extractos, el ST-99 presentó mejores capacidades de reversión que el extracto de menor riqueza, confirmando la idea antes mencionada de que la capacidad antioxidante está relacionada con el contenido total de polifenoles (Anastasiadi y cols., 2012; Doshi y cols., 2015).

A continuación, siguiendo los requerimientos de la EFSA para la presentación de solicitudes de nuevos aditivos (EFSA, 2012), se debería realizar una evaluación de la capacidad genotóxica *in vitro* de las sustancias de estudio mediante dos ensayos: el test de Ames y el ensayo de MN. Considerando los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad, morfológicos y de estrés oxidativo, decidimos continuar los estudios con el extracto ST-99 ya que presenta mejor perfil toxicológico. Además, este extracto presentó una buena estabilidad en vinos, no perjudicando a la calidad del vino ni a sus propiedades sensoriales (Gutiérrez-Escobar y cols., 2021).

En primer lugar, realizamos el test de Ames siguiendo las directrices de la guía 471 de la OCDE con modificaciones de Maron y Ames (1983) en ausencia y presencia de la fracción metabólica de hígado de rata S9. Se utilizaron cinco cepas auxotróficas de histidina de *Salmonella typhimurium* (TA97A, TA98, TA100, TA102 y TA1535) y las concentraciones de exposición del extracto ST-99 fueron de 48 a 5000 µg/placa. Nuestros resultados indican un aumento significativo de colonias revertidas en la cepa TA97A en ausencia y en presencia de la mezcla S9 a 1563 µg/placa y a 1563 y 5000 µg/placa, respectivamente. Por otro lado,

en la cepa TA102 se produjo una disminución tras la exposición desde 48 a 153 $\mu\text{g}/\text{placa}$ y un aumento a 1463 $\mu\text{g}/\text{placa}$. Los resultados positivos en TA97A podrían indicar que tanto el extracto como sus metabolitos causan un desfase en la lectura del ADN, mientras que la cepa TA102 es más sensible a los múgatenos oxidantes (Stagos y cols., 2007) e indica que su mecanismo de acción consiste en una sustitución en los pares de bases. Sin embargo, según el protocolo OCDE 471, se considera que la sustancia de estudio tiene potencial mutagénico cuando exista una relación dosis-respuesta entre las concentraciones probadas y el número de colonias revertidas inducidas en por lo menos una dosis, siendo el índice de mutagenicidad (IM) mayor a 2. En nuestro caso, el IM nunca superó el valor de 2 en ninguna de las condiciones experimentales ensayadas, por lo que ni el extracto ST-99 ni sus metabolitos mostraron potencial mutagénico a ninguna de las concentraciones y cepas ensayadas.

Los estudios sobre la mutagenicidad de extractos naturales son muy escasos. Se ha evaluado un extracto rico en proantocianidinas procedente de semillas de uva utilizando las cepas de *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535 y TA1537. Este extracto, aunque inhibió el crecimiento de TA98 y TA100 a una dosis de 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, no produjo ningún aumento significativo en el número de colonias revertidas en presencia o en ausencia de S9 (Yamakoshi y cols., 2002). Por otro lado, cuando se evaluó el perfil toxicológico de un extracto rico en polifenoles también procedente de pieles y semillas de uva se obtuvieron resultados positivos para las cepas TA98 y TA1537 (Lluís y cols., 2011). En vista de estos resultados contradictorios, podemos concluir que las diferencias en la composición de estos extractos y las posibles interacciones entre los compuestos presentes en ellos determinará su potencial genotóxico. Por otro lado, nuestros resultados son similares a los obtenidos por otros autores con el *trans*-resveratrol de manera individual. Se ha estudiado este compuesto en las cepas TA1535, TA1537, TA98, TA100 y TA102 de *Salmonella typhimurium*, indicándose que no hubo indicios de una respuesta mutagénica en ninguna de las cepas, ni en presencia ni en ausencia de la mezcla S9, en ninguna de las concentraciones ensayadas (0-5000 $\mu\text{g}/\text{placa}$) (Sokolowski, 2012). Además, estos resultados han sido confirmados por otros autores que también utilizaron las cepas TA1535, TA1537, TA98, TA100 (Czeczot y cols., 2003; Edwards y May, 2007; Edwards y Sokolowski, 2009) y la cepa *E. coli* WP2 uvrA (Edwards y May, 2007). En cuanto a las *trans*- ϵ -viniferin no existe ningún estudio relativo a su mutagenicidad hasta el momento en la literatura científica.

Además del estudio de mutagenicidad, la evaluación del potencial genotóxico es un paso crítico para los nuevos aditivos debido a la implicación que podrían tener con el desarrollo de procesos cancerígenos y defectos hereditarios (EFSA, 2011). Por ello, siguiendo las directrices de la EFSA, realizamos el ensayo de MN en la línea celular L5178Y

TK^{+/-} en presencia y ausencia de S9 con el propósito de identificar si el extracto o bien sus metabolitos pueden dar lugar a la formación de MN que contengan fragmentos o cromosomas enteros (Lluís y cols., 2011). Se llevó a cabo de acuerdo con la directriz 487 de la OCDE, seleccionándose cinco concentraciones de exposición en base a resultados de citotoxicidad previos (4 a 64 µg/ml y de 3,75 a 60 µg/ml en ausencia y presencia de la mezcla S9, respectivamente). En ausencia de la mezcla S9, nuestros resultados no mostraron un aumento significativo en el número de células binucleadas con MN (CBMN) después de 4 h y 24 h de exposición a ninguna de las concentraciones estudiadas de extracto ST-99 (4-64 µg / mL). Sin embargo, sí se observó un aumento significativo de CBMN a la concentración más alta (60 µg /mL) en presencia de la fracción metabólica S9 después de 4 h de exposición. Estos resultados sugieren que son los metabolitos formados los que ejercen cierto efecto genotóxico.

Hasta el momento, no hemos encontrado en la literatura disponible otros autores que evalúen extractos ricos en estilbenos utilizando el ensayo de MN *in vitro*, aunque algunos estilbenos se han evaluado de manera individual utilizando este ensayo. En este sentido, el *trans*-resveratrol es el más estudiado. Schmitt y col. (2002) evaluaron su genotoxicidad *in vitro* en células las L5178Y indicando que el *trans*-resveratrol produjo una reducción en la proliferación celular y en la viabilidad celular, así como una inducción de MN. De manera similar, este compuesto también aumentó la frecuencia de MN en células de pulmón CHL tras 24 h y 48 h de exposición (Matsuoka y cols., 2001). Sin embargo, en ninguno de estos ensayos se utilizó la fracción S9, por lo que los efectos de sus metabolitos no fueron ensayados. En este sentido, recientemente se ha demostrado que el derivado 3,5,4' trimetoxiestilbeno provoca un aumento en la formación de MN tras su metabolización (Mizuno y cols., 2017). Por lo tanto, estos últimos autores sugieren que son los metabolitos los que dan lugar a este efecto genotóxico corroborando nuestros resultados.

Basándonos en los criterios de la EFSA (2011) y considerando que el test de Ames y el ensayo de MN han dado lugar a resultados contradictorios, es apropiado realizar otras pruebas *in vitro* para completar la evaluación. Por ello, hemos realizado el ensayo cometa, ya que se trata de una técnica sensible y rápida para medir roturas de cadenas de ADN (Collins, 2004). Además, estas roturas pueden producirse por oxidación de las bases y teniendo en cuenta el potencial prooxidante de los estilbenos, hemos realizado el ensayo cometa modificado con FPG, enzima capaz de convertir las bases oxidadas en roturas detectables mediante electroforesis (Gielazyn y cols., 2003). En el ensayo cometa estándar y modificado, el extracto ST-99 no provocó daño en el ADN en las células Caco-2 y HepG2 en ninguna de las concentraciones probadas (de 4,82 a 27,79 µg /ml y 6,64 a 31,90 µg /ml, respectivamente). Son muy escasos los estudios que evalúen extractos ricos en estilbenos

utilizando el ensayo cometa. Otros autores han llevado a cabo un estudio sobre el daño producido en el ADN de un extracto obtenido de brotes de vid con una riqueza en estilbenos de 37,1% y de sus compuestos mayoritarios (*trans*-resveratrol, *trans*- ϵ -viniferina, r2-viniferina y hopeaphenol) utilizando el ensayo cometa estándar y modificado con FPG. Sus resultados son opuestos a los nuestros, ya que su extracto sí que produjo rotura y oxidación de las bases purinas del ADN. Sin embargo, los resultados obtenidos con los estilbenos de manera individual muestran que ninguno de ellos produce rotura de la hebra de ADN, aunque una oxidación en las bases purinas sí se observó tras la exposición de los tetrámeros (r2-viniferin y hopeaphenol) (Baechler y cols., 2013). A la vista de estos resultados y comparándolos con los obtenidos en la presente tesis doctoral, podemos concluir que los extractos naturales con estilbenos deben ser estudiados caso por caso ya que, aunque se conozca la actividad individual de estos compuestos, su efecto en combinación puede ser diferente.

Por otro lado, varios autores han demostrado que estilbenos como el resveratrol y el pterostilbeno, y algunos extractos procedentes de *Vitis Vinifera* protegen al ADN frente a procesos oxidativos (Apostolou y cols., 2013; Esatbeyoglu y cols., 2016; Freyssin y cols., 2020; Rauf y cols., 2017; Rossi y cols., 2013). Esto es de gran interés puesto que la inducción del daño oxidativo en el ADN es un paso crucial en el desarrollo de cáncer y procesos degenerativos como enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, así como el envejecimiento prematuro (Freyssin y cols., 2020; Rauf y cols., 2017). En este sentido, hemos evaluado el potencial de protección y reparación del ADN del extracto ST-99 ante el daño oxidativo producido por H₂O₂ y por Ro19-8022. Se escogieron estos dos compuestos debido a que el H₂O₂ es el principal mediador del estrés oxidativo y un potente oxidante que genera roturas en la hebra del ADN, y el Ro19-8022 es un fotosensibilizador que produce la oxidación específica de las bases purinas.

Nuestros resultados indican que el extracto ST-99 disminuye significativamente el daño oxidativo en el ADN producido por H₂O₂ y por Ro19-8022 en los ensayos de protección y reversión en las células HepG2 y Caco-2 a las concentraciones más altas ensayadas durante 24 y 48 h de exposición. De manera similar, otros autores han estudiado un extracto rico en estilbenos, cuyo estilbeno mayoritario es la *trans*- ϵ -viniferina, procedente de raíces de *Vitis Vinifera* por su capacidad de proteger al ADN del daño producido por H₂O₂. Los resultados del ensayo cometa indicaron que este extracto contrarrestó los efectos del oxidante en células de colon HT-29 de manera moderada pero significativa, corroborando la idea de que los extractos naturales con estilbenos protegen al ADN de la oxidación (Esatbeyoglu y cols., 2016).

Una vez completada la evaluación *in vitro* de la mutagenicidad y genotoxicidad del extracto ST-99, debido a los resultados contradictorios observados y siguiendo las recomendaciones de la EFSA, el siguiente paso en la presente tesis doctoral fue realizar un ensayo *in vivo* para aclarar la situación y obtener resultados más concisos y extrapolables al ser humano. Para ello, hicimos el ensayo de MN y cometa combinado en ratas Wistar siguiendo el protocolo propuesto por Bowen y cols., (2011) con el fin de disminuir el número de animales a utilizar. La exposición se realizó por sonda nasogástrica, siendo el estómago, hígado y sangre los órganos seleccionados para llevar a cabo los ensayos, siguiendo las recomendaciones de la guía 489 de la OCDE. Además, para aumentar la sensibilidad del ensayo y determinar si este extracto presenta efectos antioxidantes o prooxidantes, incorporamos las enzimas de restricción FPG y endonucleasa III (Endo-III). Por otro lado, las concentraciones utilizadas fueron seleccionadas en función de la cantidad del extracto ST-99 que llegaría al humano aplicando 100 como factor de incertidumbre (90, 180 y 360 mg de ST-99/kg de peso corporal).

Los resultados obtenidos en el ensayo cometa estándar indican que este extracto no produce rotura de la hebra de ADN a ninguna de las concentraciones ensayadas en ninguno de los órganos estudiados. Estos datos son similares a los obtenidos en la evaluación genotóxica del extracto ST-99 en modelos *in vitro*. Además, Attia, (2012) demostraron que 7 días de administración oral de resveratrol (100 mg / kg) no indujeron ningún aumento en las roturas de la cadena de ADN en células de la médula ósea de ratón. También se ha demostrado que una dosis de 100 mg/kg de peso corporal por vía intraperitoneal de resveratrol no produce daño en el ADN en los tejidos hepáticos y renales de ratas Wistar (Aydin y cols., 2013).

Por otro lado, también realizamos el ensayo cometa modificado con enzimas ya que dependiendo de las condiciones de reacción, su concentración, tiempo de exposición y tipo de células, no es raro que los compuestos fitoquímicos muestren actividades tanto antioxidantes como prooxidantes, dando lugar a radicales libres que podrían provocar la rotura oxidativa del ADN, daño de proteínas y lípidos y por lo tanto desencadenar el inicio, promoción y progresión del cáncer (Alarcón de la Lastra y Villegas, 2007; Ferguson, 2001; Mena y cols., 2009; Erdogan y Ozkan, 2012; Plauth y cols., 2016). Los resultados obtenidos no mostraron oxidación de las bases púricas o pirimidínicas en las células de estómago, hígado y sanguíneas. Esto concuerda con los ensayos realizados previamente que mostraron que el extracto ST-99 no produjo daño oxidativo en el ADN en las líneas celulares HepG2 y Caco-2. Además, como se demostró anteriormente, el extracto a bajas concentraciones redujo las ERO y exhibió efectos protectores de ADN contra agentes oxidantes como H₂O₂ y Ro19-8022. Por otro lado, de manera similar, estudios realizados

con el *trans*-resveratrol indican que este compuesto no da a lugar a diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control en el ensayo cometa modificado con FPG en células hepáticas y renales de ratas (Aydin y cols., 2013).

Los resultados obtenidos en el ensayo de MN realizado en médula ósea muestran que la ratio entre eritrocitos policromáticos y normocromáticos de los controles negativos y solventes es igual a la obtenida en animales expuestos al extracto ST-99. Además, no se observó un aumento en el número de células micronucleadas en ninguno de los grupos tratados de ambos sexos. Estos resultados son contradictorios con los obtenidos en la evaluación genotóxica *in vitro* del extracto. Estas diferencias pueden deberse a deficiencias en el metabolismo, la función de p53 y la capacidad de reparación del ADN de la mayoría de las líneas celulares utilizadas (Kirkland y cols., 2007). Además, los principios toxicológicos de la FDA para la evaluación de la seguridad de los ingredientes alimentarios (FDA, 1982; De Santi y cols., 2000) establecieron que resultados positivos de genotoxicidad *in vitro* que no se manifiestan *in vivo* pueden ser debidos a cambios en el pH, osmolalidad o altos niveles de citotoxicidad. Por otro lado, las sustancias suelen ser menos tóxicas en modelos *in vivo* ya que pueden ocurrir procesos de desintoxicación (EFSA, 2011; Kirkland y cols., 2007).

Hasta donde sabemos, la genotoxicidad *in vivo* de otros extractos de estilbenos aún no se ha evaluado adecuadamente. Sólo hay un estudio en el que evaluaron la capacidad de un extracto de semillas de Melinjo, rico en *trans*-resveratrol y dímeros y glucósidos de resveratrol, para producir aberraciones cromosómicas en ratas (Tatefuji y cols., 2014). Estos autores afirmaron que dosis de hasta 4000 mg/kg/día de este extracto no indujeron efectos genotóxicos. Por otro lado, sí se ha llevado una evaluación de la genotoxicidad completa del *trans*-resveratrol de manera individual, lo cual ha permitido que la EFSA apruebe su uso (EFSA, 2016). Se obtuvieron resultados negativos cuando se estudió la genotoxicidad *in vivo* del resveratrol individualmente. Hynes (2007) realizó un ensayo de MN en mamíferos utilizando ratas Sprague-Dawley a las que se les administró 0, 500, 1000 o 2000 mg/kg de peso corporal por día de *trans*-resveratrol durante 2 días consecutivos por sonda. No hubo cambios en la proporción de eritrocitos inmaduros, ni aumento de eritrocitos micronucleados a ninguna dosis de resveratrol, por lo que los resultados indican una ausencia de actividad clastogénica *in vivo* de este estilbeno (EFSA, 2016; Hynes, 2007). Además, los efectos de Resvida™, una preparación de *trans*-resveratrol puro, se evaluó en células de médula ósea de rata Sprague Dawley de acuerdo con OCDE 474, indicándose que esta preparación no presenta efectos genotóxicos hasta 2000 mg/kg de peso corporal/día (Williams y cols., 2009).

Siguiendo las recomendaciones de la OCDE, la ausencia de genotoxicidad, tanto en el ensayo de MN como cometa, debe ser corroborada con algún método que confirme que los tejidos diana han sido expuestos a la sustancia de estudio (OCDE 474 y OCDE 489). Por ello, hemos realizado un examen histopatológico en estómago e hígado, y además se ha llevado a cabo un estudio analítico con el fin de confirmar la presencia de los estilbenos en sangre de las ratas tratadas.

El extracto a las dosis más bajas ensayadas (90 y 180 mg / kg de peso corporal) no indujo daño histopatológico relevante en los tejidos observados bajo microscopía óptica. Sin embargo, a 360 mg/kg de peso corporal del extracto se detectó un leve daño. Se mostraron procesos de degeneración glucogénica, núcleos pequeños y basófilos, con procesos de apoptosis, presentando procesos de una incipiente hepatitis. Asimismo, se observó en la parte externa de la mucosa gástrica una película de mucosidad, aunque no se produce necrosis, por lo tanto, se corresponde con un proceso de gastritis catarral descamativa ligera. Por el contrario, en los estudios morfológicos realizados *in vitro* en células hepáticas y de colon, sí se detectaron cambios importantes. La línea de células humanas de hígado HepG2 expuesta a 31,91 µg/mL del extracto mostró proyecciones citoplasmáticas que se convertirían en cuerpos apoptóticos. Además, ST-99 indujo la ruptura del ciclo celular al inhibir la proliferación celular y causó la muerte celular principalmente por apoptosis. Los núcleos de las células apoptóticas pueden ser pequeños y regulares según Eidet y cols., 2014. Así, el proceso apoptótico observado *in vitro* podría explicar los núcleos pequeños que han aparecido *in vivo*. Además, las concentraciones ensayadas en animales han sido superiores a las utilizadas en los ensayos *in vitro*, entonces, la ausencia de efectos importantes *in vivo* puede deberse a las diferencias en el metabolismo y la biodisponibilidad del extracto en los órganos diana o porque se utilizaron diferentes especies, ratas en estudio *in vivo* y líneas celulares humana *in vitro*.

Por otro lado, la evidencia de exposición de la médula ósea a una sustancia puede determinarse si existe una disminución de la relación entre eritrocitos inmaduros y maduros. Sin embargo, en nuestro ensayo este parámetro no cambia entre las ratas control y las tratadas, y por ello siguiendo las recomendaciones del protocolo, realizamos un estudio analítico con el fin de confirmar la presencia de los estilbenos en sangre utilizando una cromatografía líquida de alta presión acoplada a un espectrómetro de masas (UPLC-HESI-MS). Este ensayo es de gran interés puesto que la biodisponibilidad de los estilbenos es baja. El *trans*-resveratrol presenta una biodisponibilidad que oscila entre 29% y 38% debido a varios factores: baja solubilidad en agua, poca vida media y rápida metabolización (Cottart y cols., 2010; Kapetanovic y cols., 2011; Mutlu y cols., 2020; Rege y cols., 2014). Por otro lado, la biodisponibilidad de la *trans*- ϵ -viniferina ha sido reportada en ratones, siendo

extremadamente baja (0.77%) (Courtois y cols., 2017; Kim y cols., 2017). Sin embargo, cuando evaluamos la biodisponibilidad de una mezcla botánica debemos considerar que pueden existir interacciones entre sus componentes afectando a este parámetro (EFSA, 2009). Los resultados obtenidos en la presente tesis indican que en el plasma de las ratas tratadas a la mayor concentración ensayada se encuentran derivados tanto de la ϵ -viniferina como del *trans*-resveratrol. La presencia de estos estilbenos y sus metabolitos en plasma es de gran interés puesto que se confirma la exposición de los órganos diana de este estudio. En concreto, la ϵ -viniferin ha sido detectada sin metabolizar y en forma de glucurónido y di-glucurónido. De acuerdo con nuestros resultados, otros autores han confirmado que la ϵ -viniferin sufre un intenso metabolismo hepático dando lugar mayoritariamente a derivados glucurónidos en ratas (Courtois y cols., 2017). Por otro lado, la presencia de derivados glucurónidos y sulfatos del *trans*-resveratrol también fue comprobada en la sangre de ratas expuestas a 360 mg/kg de peso corporal. En concordancia con estos resultados, se ha demostrado previamente que en ratas los principales metabolitos del *trans*-resveratrol son el resveratrol-3-O-glucuronido y resveratrol-3-O sulfato (Lou y cols., 2014).

De forma global, los resultados obtenidos en el ensayo combinado de MN y cometa llevado a cabo en ratas indican que el extracto ST-99 no tiene potencial genotóxico a las concentraciones ensayadas (90, 180 y 360 mg/kg de peso corporal). Además, aunque se observó un leve daño histopatológico en estómago e hígado, tan sólo fue a la concentración más alta ensayada, la cual es 100 veces superior a la cantidad que llegaría al humano en un consumo habitual de vino que contuviera el extracto como aditivo. Estos datos confirman que tanto el estómago como el hígado han sido expuestos a nuestro extracto. Por otro lado, se ha demostrado la presencia de los estilbenos en plasma de las ratas tratadas, por lo que se confirma que el extracto llegó a la médula ósea pero no causó daño en los eritrocitos.

En conclusión, los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral constituyen un avance en el conocimiento de la seguridad asociada a los estilbenos y a los extractos naturales que los contienen para su posible uso como aditivos.

VII. CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

De los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis doctoral se ha llegado a las siguientes conclusiones:

PRIMERA. La revisión de los ensayos de toxicidad *in vitro* e *in vivo* del piceatanol, pterostilbeno y la ϵ -viniferina indica que todos los compuestos producen daño citotóxico en líneas celulares cancerígenas y no cancerígenas, y este daño puede dar lugar a roturas del ADN. Sin embargo, no existen estudios sobre la genotoxicidad *in vitro* e *in vivo* de estos compuestos siguiendo las recomendaciones de la EFSA.

SEGUNDA. Se ha demostrado que los dos extractos estudiados, uno con una riqueza en estilbenos de 45.4% y otro con un 99% (ST-99), *trans*- ϵ -viniferina y su mezcla con *trans*-resveratrol (1:3.9) producen efectos citotóxicos en las líneas celulares HepG2 y Caco-2. Sin embargo, *trans*-resveratrol tan sólo produjo una leve citotoxicidad. Además, se observaron cambios ultraestructurales en las células expuestas a los extractos y la mezcla de estilbenos. Por otro lado, el efecto antagónico de la combinación de *trans*- ϵ -viniferin y *trans*-resveratrol ha sido demostrado por primera vez mediante un ensayo de isobogramas en las células HepG2 y Caco-2.

TERCERA. La capacidad de ambos extractos, *trans*- ϵ -viniferina y su mezcla con el *trans*-resveratrol para disminuir las ERO y aumentar el contenido de GSH fue demostrada en las HepG2 y Caco-2. Además, estos compuestos fueron capaces de proteger y revertir el daño causado por un agente oxidante (H_2O_2). El extracto de mayor riqueza ST-99 fue el que demostró unos efectos antioxidantes más potente de todos los compuestos ensayados. Sin embargo, el *trans*-resveratrol no demostró tener actividad antioxidante.

CUARTA. El extracto ST-99 no es un potencial mutageno según el test de Ames en cepas de *S. typhymurium* ni en presencia ni ausencia de la fracción microsómica S9. Por otro lado, el extracto a 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en presencia de S9 produjo un aumento en las CBMN en células L5178Y TK^{+/+} mediante el ensayo de MN. Además, el ensayo cometa confirmó que el extracto ST-99 no produce rotura directa de la hebra de ADN ni oxidación de las bases purinas, y, también, fue capaz de proteger y revertir el daño oxidativo en el ADN causado por H_2O_2 y Ro19-8022.

QUINTA. La evaluación de la genotoxicidad *in vivo* en ratas Wistar del ST-99 mostró ausencia de genotoxicidad tanto en el ensayo de MN (OCDE 474) como en el ensayo cometa (OCDE 489) en las ratas tratadas. Asimismo, el uso de enzimas de restricción no reveló daño oxidativo en el ADN. Por otro lado, a la dosis ensayada más alta, la cual es 100 veces superior a la que llegaría al consumidor (360 mg/kg de peso), se demostraron procesos de degeneración glucogénica, células claras, núcleos pequeños y basófilos, indicando una

incipiente hepatitis. Igualmente, tras la exposición a esta misma dosis, se observa un proceso de gastritis catarral descamativa ligera en la parte externa de la mucosa gástrica. Por otro lado, la ausencia de genotoxicidad fue comprobada con una técnica analítica que confirmó que los tejidos diana habían sido expuestos al extracto.

CONCLUSIÓN GENERAL. Los resultados obtenidos en los ensayos realizados en esta tesis doctoral indican que el extracto ST-99 presenta interesantes propiedades antioxidantes y un leve potencial genotóxico *in vitro*. En el ensayo *in vivo*, este extracto no produjo efectos genotóxicos y aunque se observaron efectos leves histopatológicos, fue a la concentración más alta ensayada (360 mg/ kg de peso). Por todo ello, el extracto ST-99 parece ser seguro para los consumidores a las concentraciones previstas para su potencial uso en el vino como sustituto del SO₂.

The following conclusions were drawn from the results obtained during the development of the present doctoral thesis:

FIRST. Review of the *in vitro* and *in vivo* toxicity assays performed in piceatannol, pterostilbene, and ϵ -viniferin indicates that all compounds cause cytotoxic damage in cancer and non-cancer cell lines, and this damage can lead to DNA breaks. However, there are no studies focusing on the *in vitro* and *in vivo* genotoxicity of these compounds following the EFSA recommendations.

SECOND. The two extracts studied, one with a stilbene richness of 45.4% and the other with 99% (ST-99), *trans*- ϵ -viniferin and its mixture with *trans*-resveratrol (1: 3.9) produced cytotoxic effects in HepG2 and Caco-2 cell lines. However, *trans*-resveratrol only induced mild cytotoxicity. Furthermore, ultrastructural changes were observed in cells exposed to the extracts and the mixture of stilbenes. On the other hand, the antagonistic effect of the combination of *trans*- ϵ -viniferin and *trans*-resveratrol has been demonstrated for the first time by an isobologram assay in HepG2 and Caco-2 cells.

THIRD. The ability of both extracts, *trans*- ϵ -viniferin and its mixture with *trans*-resveratrol to decrease ROS levels and increase GSH content was demonstrated in HepG2 and Caco-2. Furthermore, these compounds were able to protect and reverse the damage caused by an oxidizing agent (H_2O_2). ST-99 presented the most potent antioxidant effect of all the compounds tested. However, *trans*-resveratrol did not show this antioxidant activity

FORTH. The ST-99 extract is not a potential mutagen according to the Ames test in *S. typhimurium* strains, neither in the presence nor in absence of the microsomal fraction S9. Moreover, the extract at 60 $\mu g / mL$ in the presence of S9 mix increased CBMN in L5178Y TK[±] cells. In addition, the comet assay confirmed that the ST-99 extract does not produce direct DNA strand break or oxidation of purine bases, and it was also able to protect and reverse oxidative damage in DNA caused by H_2O_2 and Ro19- 8022.

FIFTH. *In vivo* genotoxicity evaluation of ST-99 in Wistar rats showed absence of genotoxicity in both MN test (OECD 474) and comet test (OECD 489) in treated rats. Likewise, the use of restriction enzymes did not reveal oxidative DNA damage. On the other hand, at the highest tested dose, which is 100 times higher than the one that would reach the consumer (360 mg / kg bw), glucogenic degeneration processes, clear cells, small nuclei and basophils were demonstrated, indicating an incipient hepatitis. Likewise, after exposure to this same dose, a process of slight desquamative catarrhal gastritis is observed in the external part of the gastric mucosa. Moreover, the absence of genotoxicity was

verified with an analytical technique that confirmed that the target tissues had been exposed to the extract.

GENERAL CONCLUSION. The results obtained this doctoral thesis indicate that the ST-99 extract has interesting antioxidant properties and a slight genotoxic potential *in vitro*. In the *in vivo* assay, this extract did not produce genotoxic effects and although slight histopathological effects were observed, it was at the highest concentration tested (360 mg/kg bw). Therefore, the ST-99 extract appears to be safe for consumers at the concentrations expected for its potential use in wine as a substitute for SO₂.

VIII.REFERENCIAS

REFERENCES

- Abca, E. E., & Akdemir Evrendilek, G. (2015). Processing of Red Wine by Pulsed Electric Fields with Respect to Quality Parameters. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 758–767. <https://doi.org/10.1111/IFPP.12285>
- Abraham, S. K., Khandelwal, N., Hintzsche, H., & Stopper, H. (2016). Antigenotoxic effects of resveratrol: Assessment of in vitro and in vivo response. *Mutagenesis*, 31(1), 27–33. <https://doi.org/10.1093/mutage/gev048>
- AECOSAN. (2016). Reevaluación de los aditivos del grupo anhídrido sulfuroso y sulfitos por la Autoridad Europea De Seguridad Alimentaria (EFSA). 2–7.
- Aggarwal, B. B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R. S., Seeram, N. P., Shishodia, S., & Takada, Y. (2004). Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical studies. In *Anticancer Research* (Vol. 24, Issue 5 A).
- Aja, I., Begoña Ruiz-Larrea, M., Courtois, A., Krisa, S., Richard, T., & Ruiz-Sanz, J. I. (2020). Screening of natural stilbene oligomers from vitis vinifera for anticancer activity on human hepatocellular carcinoma cells. *Antioxidants*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/antiox9060469>
- Alañón, M. E., García-Ruiz, A., Díaz-Maroto, M. C., Pérez-Coello, M. S., & Moreno-Arribas, M. V. (2015). Antimicrobial and antioxidant activity of pressurized liquid extracts from oenological woods. *Food Control*, 50, 581–588. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.09.043>
- Alarcón De La Lastra, C., & Villegas, I. (2007). Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: Mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transactions*, 35(5), 1156–1160. <https://doi.org/10.1042/BST0351156>
- Amato, M., Ballco, P., López-Galán, B., De Magistris, T., & Verneau, F. (2017). Exploring consumers' perception and willingness to pay for "Non-Added Sulphite" wines through experimental auctions: A case study in Italy and Spain. *Wine Economics and Policy*, 6(2), 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.wep.2017.10.002>
- Anand, S. P., & Sati, N. (2013). Artificial Preservatives and Their Harmful Effects: Looking Toward Nature for Safer Alternatives. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research IJPSR*, 4(7), 2496–2501. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.4\(7\).24960-01](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.4(7).24960-01)
- Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Skaltsounis, A. L., & Haroutounian, S. A. (2012). Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their in vitro antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*, 48(2), 316–322. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.006>
- Ancín-Azpilicueta, C., Jiménez-Moreno, N., Moler, J. A., Nieto-Rojo, R., & Urmeneta, H. (2016). Effects of reduced levels of sulfite in wine production using mixtures with lysozyme and dimethyl dicarbonate on levels of volatile and biogenic amines. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 33(10), 1518–1526. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1232864>
- Apostolou, A., Stagos, D., Galitsiou, E., Spyrou, A., Haroutounian, S., Portesis, N., Trizoglou, I., Wallace Hayes, A., Tsatsakis, A. M., & Kouretas, D. (2013). Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of Vitis vinifera stem extracts. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 61, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.029>
- Arús, B. A., Souza, D. G., Bellaver, B., Souza, D. O., Gonçalves, C. A., Quincozes-Santos, A., & Bobermin, L. D. (2017). Resveratrol modulates GSH system in C6 astroglial cells through heme oxygenase 1 pathway. *Molecular and cellular biochemistry*, 428(1-2), 67–77. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2917-5>
- Attia, S. M. (2012). Influence of resveratrol on oxidative damage in genomic DNA and apoptosis induced by cisplatin. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 741(1–2), 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.10.008>
- Aydin, S., M. Bacanlı, G. Taner, T. Şahin, A. A. Başaran, and N. Başaran. 2013. "Protective Effects of Resveratrol on Sepsis-Induced DNA Damage in the Lymphocytes of Rats." *Human and Experimental Toxicology* 32(10):1048–57. <https://doi.org/10.1177/0960327112467047>.
- Baechler, S. A., Schroeter, A., Dicker, M., Steinberg, P., & Marko, D. (2014). Topoisomerase II-targeting properties of a grapevine-shoot extract and resveratrol oligomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(3), 780–788. <https://doi.org/10.1021/jf4046182>
- Bakker, J., & Clarke. (2004) Wine flavour chemistry. Wiley Online Library.
- Balasubramani, S. P., Rahman, M. A., & Basha, S. M. (2019). Synergistic action of stilbenes in muscadine grape berry extract shows better cytotoxic potential against cancer cells than resveratrol alone. *Biomedicines*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/biomedicines7040096>

- Baltrop, J.A., Owen, T.C., Cory, A.H., & Cory, J.G. (1991). 5-((3-Carboxyphenyl)-3-(4, 5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 2-(4, 5-dimethylthiazolyl)-2, 5-diphenylterazolium bromide (MTT) reducing to purple water soluble formazan as cell-viability indicators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1, 611.
- Barbalho, S. M., Bueno Ottoboni, A. M. M., Fiorini, A. M. R., Guiguer, É. L., Nicolau, C. C. T., Goulart, R. de A., & Flato, U. A. P. (2020). Grape juice or wine: which is the best option? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1–14. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1710692>
- Barjot, C., Tournaire, M., Castagnino, C., Vigor, C., Vercauteren, J., & Rossi, J. F. (2007). Evaluation of antitumor effects of two vine stalk oligomers of resveratrol on a panel of lymphoid and myeloid cell lines: Comparison with resveratrol. *Life Sciences*, 81(23–24), 1565–1574. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.08.047>
- Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V. V., Allard, J. S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P. J., Poosala, S., Becker, K. G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K. W., Spencer, R. G., Lakatta, E. G., ... Sinclair, D. A. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444(7117), 337–342. <https://doi.org/10.1038/nature05354>
- Baydar, N.G., O'zkan, G., & Yasar, S. (2007). Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food Control*, 18, 1131–1136. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.06.011>
- Beck, M., Mair, P., Bruchlen, M., & Loechleiter, F. (2006). In vitro absorption and metabolism studies with 14C-resveratrol. *Internal DSM report. DSM Nutritional Products Ltd.*, Basel. Report Number: 2500288.
- Benmeziane, F. (2017). Hydrogen peroxide scavenging activity of grape (*Vitis vinifera*) methanolic extract. *Food Research*, 1(2), 39–42. <https://doi.org/10.26656/fr.2017.2.005>
- Bermúdez-Aguirre, D., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2012). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in pineapple, grape and cranberry juices under pulsed and continuous thermo-sonication treatments. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 383–392. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.06.038>
- Biais, J., Krisa, S., Cluzet, S., Da Costa, G., Wafflo-Teguó, Mérillon, J-M., & Richard, T. (2017). Antioxidant and Cytoprotective Activities of Grapevine Stilbenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 4952–4960. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01254>
- Billard, C., Izard, J. C., Roman, V., Kern, C., Mathiot, C., Mentz, F., & Kolb, J. P. (2002). Comparative antiproliferative and apoptotic effects of resveratrol, ϵ -viniferin and vine-shots derived polyphenols (Vineatrols) on chronic B lymphocytic leukemia cells and normal human lymphocytes. *Leukemia and Lymphoma*, 43(10), 1991–2002. <https://doi.org/10.1080/1042819021000015952>
- Bingöl, G., Gülkaç, M. D., Dillioğlugil, M. Ö., Polat, F., & Kanli, A. Ö. (2014). Effect of resveratrol on chromosomal aberrations induced by doxorubicin in rat bone marrow cells. *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis*, 766, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.03.008>
- Bobermin, L. D., Souza, D. O., Gonçalves, C. A., & Quincozes-Santos, A. (2018). Resveratrol prevents ammonia-induced mitochondrial dysfunction and cellular redox imbalance in C6 astroglial cells. *Nutritional Neuroscience*, 21(4), 276–285. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1284375>
- Bordiga, M., Travaglia, F., Locatelli, M., Arlorio, M., & Coisson, J. D. (2015). Spent grape pomace as a still potential by-product. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(9), 2022–2031. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12853>
- Borenfreund, E., & Puerner, J.A. (1984). A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assays. *Journal of Tissue Culture Methods*, 9, 7–9.
- Bornšek, S.M., Polak, T., Skrt, Mihaela, Demšar, L., Ulrih, N.P., & Abram, V. (2015). Effects of industrial and home-made spread processing on bilberry phenolics. *Food Chemistry*, 173, 61–69. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.005>
- Bowen, D.E., Whitwell, J.H., Lillford, L., Henderson, D., Kidd, D., McGarry, S., Pearce, G., Beevers, C., & Kirkland, D.J. (2011). Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 722, 7–19.
- Bradford, M. (1976). A rapid sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Briones-Labarca, V., Perez-Wom, M., Habib, G., Giovagnoli-Vicuña, C., Cañas-Sarazua, R., Tabilo-Munizaga, G., & Salazar, F. N. (2017). Oenological and quality characteristic on young white wines (Sauvignon Blanc): Effects of high hydrostatic pressure processing. *Journal of Food Quality*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8524073>
- Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Michael, L.J.E., & Crozier, A. (2002). Plant foods and herbal sources of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 11, 3337–3340. <https://doi.org/10.1021/jf0112973>

- Cai, Y. J., Wei, Q. Y., Fang, J. G., Yang, L., Liu, Z. L., Wyche, J. H., & Han, Z. (2004). The 3, 4-Dihydroxyl Groups are Important for trans-Resveratrol Analogs to Exhibit Enhanced Antioxidant and Apoptotic Activities. *Anticancer Research*, 24(2 B), 999–1002.
- Caillaud, M., Guillard, J., Richard, D., Milin, S., Chassaing, D., Paccalin, M., Page, G., & Bilan, A. R. (2019). Trans- ϵ viniferin decreases amyloid deposits and inflammation in a mouse transgenic Alzheimer model. *PLoS ONE*, 14(2), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212663>
- Carsten, R. E., Bachand, A. M., Bailey, S. M., & Ullrich, R. L. (2008). Resveratrol reduces radiation-induced chromosome aberration frequencies in mouse bone marrow cells. *Radiation research*, 169(6), 633–638. <https://doi.org/10.1667/RR1190.1>
- Carstens, C., Deckwart, M., Webber-Witt, M., Schäfer, V., Eichhorn, L., Brockow, K., Fischer, M., Christmann, M., & Paschke-Kratzin, A. (2014). Evaluation of the efficiency of enological procedures on lysozyme depletion in wine by an indirect ELISA method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(26), 6247–6253. <https://doi.org/10.1021/jf405319j>
- Castillo-Pichardo, L., & Dharmawardhane, S. F. (2012). Grape polyphenols inhibit Akt/mammalian target of rapamycin signaling and potentiate the effects of gefitinib in breast cancer. *Nutrition and Cancer*, 64(7), 1058–1069. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.716898>
- Cebrián-Tarancón, C., Sánchez-Gómez, R., Carot, J. M., Zalacain, A., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2019). Assessment of vine-shoots in a model wines as enological additives. *Food Chemistry*, 288(January), 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.075>
- Celik, A. T. (2012). Potential Genotoxic and Cytotoxic Effects of Plant Extracts. *A Compendium of Essays on Alternative Therapy, January 2012*. <https://doi.org/10.5772/28488>
- Chatterjee, K., Mukherjee, S., Vanmanen, J., Banerjee, P., & Fata, J. E. (2019). Dietary polyphenols, resveratrol and pterostilbene exhibit antitumor activity on an HPV E6-positive cervical cancer model: An in vitro and in vivo analysis. *Frontiers in Oncology*, 9(MAY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00352>
- Chen, K., Han, S. Y., Zhang, B., Li, M., & Sheng, W. J. (2015). Development of lysozyme-combined antibacterial system to reduce sulfur dioxide and to stabilize Italian Riesling ice wine during aging process. *Food Science and Nutrition*, 3(5), 453–465. <https://doi.org/10.1002/fsn3.238>
- Cheng, A. S., Cheng, Y. H., Chiou, C. H., & Chang, T. L. (2012). Resveratrol upregulates Nrf2 expression to attenuate methylglyoxal-induced insulin resistance in hep G2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 9180–9187. <https://doi.org/10.1021/jf302831d>
- Chételat, A., Beck, M., & Wolz, E. (2003). Resveratrol: Micronucleus test in rat bone marrow - oral administration (gavage) - Study No.:479M03, DSM Nutritional Products Ltd. (former Roche Vitamins AG), Basel. Report Number: 1000543.
- Cheyrier, V. (2012). Phenolic compounds: From plants to foods. *Phytochemistry Reviews*, 11(2–3), 153–177. <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9242-8>
- Colin, D., Gimazane, A., Lizard, G., Izard, J. C., Solary, E., Latruffe, N., & Delmas, D. (2009). Effects of resveratrol analogs on cell cycle progression, cell cycle associated proteins and 5fluoro-uracil sensitivity in human derived colon cancer cells. *International Journal of Cancer*, 124(12), 2780–2788. <https://doi.org/10.1002/ijc.24264>
- Colin, D., Lancon, A., Delmas, D., Lizard, G., Abrossinow, J., Kahn, E., Jannin, B., & Latruffe, N. (2008). Antiproliferative activities of resveratrol and related compounds in human hepatocyte derived HepG2 cells are associated with biochemical cell disturbance revealed by fluorescence analyses. *Biochimie*, 90(11–12), 1674–1684. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.06.006>
- Collins, A.R., Duthie, S.J., & Dobson, V.L. (1993). Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14, 1733-1735.
- Collins A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular biotechnology*, 26(3), 249–261. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>
- Corrales, M., García, A.F., Butz, P., & Tauscher, B. (2009). Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering*, 90, 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.07.003>
- Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S., van Benthem, J., & Vanparys, P. (2008). ECVAM retrospective validation of the *in vitro* micronucleus test (MNT). *Mutagenesis* 27(1), 271–283.
- Costanigro, M., Appleby, C., & Menke, S. D. (2014). The wine headache: consumer perceptions of sulfites and willingness to pay for non-sulfited wines. *Food Quality and Preference*, 31: 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2013.08.002>
- Cottart, C. H., Nivet-Antoine, V., Laguillier-Morizot, C., & Beaudeau, J. L. (2010). Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54(1), 7–16. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900437>

- Courtois, A., Jourdes, M., Dupin, A., Lapèze, C., Renouf, E., Biais, B., Teissedre, P. L., Mérillon, J. M., Richard, T., & Krisa, S. (2017). In vitro glucuronidation and sulfation of ϵ -viniferin, a resveratrol dimer, in humans and rats. *Molecules*, *22*(5), 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules22050733>
- Courtois, A., Garcia, M., Krisa, S., Atgié, C., Sauvant, P., Richard, T., & Faure, C. (2019). Encapsulation of ϵ -viniferin in onion-type multi-lamellar liposomes increases its solubility and its photo-stability and decreases its cytotoxicity on Caco-2 intestinal cells. *Food and Function*, *10*(5), 2573–2582. <https://doi.org/10.1039/c9fo00420c>
- Cutrim, C. S., & Cortez, M. A. S. (2018). A review on polyphenols: Classification, beneficial effects and their application in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, *71*(3), 564–578. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12515>
- Czczot, H., Podsiad, M., Skrzycki, M., Stochmal, A., & Oleszek, W. (2003). Evaluation of the mutagenic activity of phenolics from the bark of *Yucca schidigera* Roetz. *Acta poloniae pharmaceutica*, *60*(5), 357–362.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly) phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants and Redox Signaling*, *18*(14), 1818–1892. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581>
- Demma, J., Engidawork, E., & Hellman, B. (2009). Potential genotoxicity of plant extracts used in Ethiopian traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, *122*(1), 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.12.013>
- Díez, L., Rojo-Bezares, B., Zarazaga, M., Rodríguez, J. M., Torres, C., & Ruiz-Larrea, F. (2012). Antimicrobial activity of pediocin PA-1 against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. *Food Microbiology*, *31*(2), 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.006>
- Divol, B., du Toit, M., & Duckitt, E. (2012). Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. *Applied microbiology and biotechnology*, *95*(3), 601–613. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4186-x>
- Doan, T. M. H., Nguyen, T. L., Trinh, T. T. Van, Vu, V. N., Phi, T. D., Litaudon, M., Roussi, F., Chau, V. M., & Pham, V. C. (2019). Cytotoxic Phenolic Compounds from Fruit Glandular Trichomes of *Macaranga tanarius*. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, *2019*, 7–12. <https://doi.org/10.1155/2019/2917032>
- Doshi, P., Adsule, P., Banerjee, K., & Oulkar, D. (2015). Phenolic compounds, antioxidant activity and insulinotropic effect of extracts prepared from grape (*Vitis vinifera* L) byproducts. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(1), 181–190. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-0991-1>
- Du, H., Ma, L., Chen, G., & Li, S. (2018). The effects of oxyresveratrol abrogates inflammation and oxidative stress in rat model of spinal cord injury. *Molecular medicine reports*, *17*(3), 4067–4073. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8294>
- Edwards, C. G., & Oswald, T. A. (2018). Interactive effects between total SO₂, ethanol and storage temperature against *Brettanomyces bruxellensis*. *Letters in applied microbiology*, *66*(1), 71–76. <https://doi.org/10.1111/lam.12816>
- Edwards, J.A., Scase, K., Burger, D., Hofmann, P., & Wilson, J. (2007). Resveratrol (Ro 40-6302/000), 3-month oral toxicity study followed by a 4-week recovery period in Wistar rats Study performed at Laboratory: Notox B.V., Hambakenwetering 7, 5231 DD'sHertogenbosch, The Netherlands; Study Project No. 452453.
- Edwards, J. A., & Sokolowsky, A. (2009). Resveratrol Photomutagenicity Reverse Mutation Assay, Harlan Cytotest Cell Research GmbH No. 1231902, DSM internal report, RDR No. 2000902.
- EFSA Scientific Committee. (2009). Guidance on safety assessment of botanicals and botanical preparations intended for use as ingredients in food supplements, on request of EFSA. *EFSA Journal*, *7* (9), 1249, 19, <https://doi.org/10.2093/j.efsa.2009.1249>
- EFSA, European Food Safety Authority. (2009b). Guidelines on submission of a dossier for safety evaluation by the EFSA of active or intelligent substances present in active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food. *EFSA Journal* 1208.
- EFSA Scientific Committee. (2011). Scientific Opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA Journal*, *9* (9), 2379, 69. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2379>
- EFSA, European Food Safety Authority. (2011b). Overview of the procedures currently used at EFSA for the assessment of dietary exposure to different chemical substances. *EFSA Journal*, *9* (12), 2490, 33 <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2490>
- EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). (2012). Guidance for submission for food additive evaluations. *EFSA Journal*, *10* (7), 2760, 60. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2760>

- EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies). (2016). Scientific opinion on the safety of synthetic trans-resveratrol as a novel food pursuant to Regulation (EC) No 258/97. *EFSA Journal*, 14 (1), 4368. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4368>
- EFSA Scientific Committee, Hardy, A., Benford, D., Halldorsson, T., Jeger, M., Knutsen, H.K., More, S., Naegeli, H., Noteborn, H., Ockleford, C., Ricci, A., Rychen, G., Silano, V., Solecki, R., Turck, D., Younes, M., Aquilina, G., Crebelli, R., Gurtler, R., Hirsch-Ernst, K.I., Mosesso, P., Nielsen, E., van Benthem, J., Carf, M., Georgiadis, N., Maurici, D., Parra Morte, J. & Schlatter, J. (2017). Scientific Opinion on the clarification of some aspects related to genotoxicity assessment. *EFSA Journal* 15(12), 5113, 25. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5113>
- EFSA Scientific Committee, More, S., Bampidis, V., Benford, D., Boesten, J., Bragard, C., Halldorsson, T., Hernandez-Jerez, A., Hougaard-Bennekou, S., Koutsoumanis, K., Naegeli, H., Nielsen, S.S., Schrenk, D., Silano, V., Turck, D., Younes, M., Aquilina, G., Crebelli, R., Gurtler, R., Hirsch-Ernst, K.I., Mosesso, P., Nielsen, E., Solecki, R., Carfi, M., Martino, C., Maurici, D., Parra Morte, J. & Schlatter, J. (2019). Statement on the genotoxicity assessment of chemical mixtures. *EFSA Journal*, 17(1), 5519, 11 <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5519>
- Eidet, J. R., Pasovic, L., Maria, R., Jackson, C. J., & Utheim, T. P. (2014). Objective assessment of changes in nuclear morphology and cell distribution following induction of apoptosis. *Diagnostic Pathology*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-9-92>
- Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B. J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J. C., Pieters, R., & Kleiner, J. (2002). Methods of in vitro toxicology. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 40(2-3), 193–236. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(01\)00118-1](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(01)00118-1)
- El Darra, N., Grimi, N., Maroun, R.G., Louka, N., & Vorobiev, E. (2013). Pulsed electric field, ultrasound, and thermal pretreatments for better phenolic extraction during red fermentation. *European Food Research & Technology*, 236, 47–56. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1858-9>
- El Khawand, T., Courtois, A., Valls, J., Richard, T., & Krisa, S. (2018). A review of dietary stilbenes: sources and bioavailability. *Phytochemistry Reviews*, 17(5), 1007–1029. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9578-9>
- Elgorashi, E. E., Taylor, J. L., Maes, A., van Staden, J., De Kimpe, N., & Verschaeve, L. (2003). Screening of medicinal plants used in South African traditional medicine for genotoxic effects. *Toxicology letters*, 143(2), 195–207. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00176-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00176-0)
- Empl, M. T., Albers, M., Wang, S., & Steinberg, P. (2015). The resveratrol tetramer r-viniferin induces a cell cycle arrest followed by apoptosis in the prostate cancer cell line LNCaP. *Phytotherapy Research*, 29(10), 1640–1645. <https://doi.org/10.1002/ptr.5443>
- Erdogan, A., & Ozkan, A. (2013). A comparative study of cytotoxic, membrane and DNA damaging effects of *Origanum majorana*'s essential oil and its oxygenated monoterpene component linalool on parental and epirubicin-resistant H1299 cells. *Biologia (Poland)*, 68(4), 754–761. <https://doi.org/10.2478/s11756-013-0196-0>
- Erexson, G. L. (2003). Lack of in vivo clastogenic activity of grape seed and grape skin extracts in a mouse micronucleus assay. *Food and Chemical Toxicology*, 41(3), 347–350. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00236-3](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00236-3)
- Esatbeyoglu, T., Ewald, P., Yasui, Y., Yokokawa, H., Wagner, A. E., Matsugo, S., Winterhalter, P., & Rimbach, G. (2016). Chemical characterization, free radical scavenging, and cellular antioxidant and anti-inflammatory properties of a stilbenoid-rich root extract of *Vitis vinifera*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8591286>
- Falguera, V., Forns, M., & Ibarz, A. (2013). UV-vis irradiation: An alternative to reduce SO2 in white wines? *LWT - Food Science and Technology*, 51(1), 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.11.006>
- Federación española del vino. (2020). <http://www.fev.es/sector-cifras/>
- Ferguson, L. R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 475(1–2), 89–111. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00073-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00073-2)
- Fenercioglu, A. K., Saler, T., Genc, E., Sabuncu, H., & Altuntas, Y. (2010). The effects of polyphenol-containing antioxidants on oxidative stress and lipid peroxidation in Type 2 diabetes mellitus without complications. *Journal of endocrinological investigation*, 33(2), 118–124. <https://doi.org/10.1007/BF03346565>
- Fernández-Pérez, R., Sáenz, Y., Rojo-Bezares, B., Zarazaga, M., Rodríguez, J. M., Torres, C., Tenorio, C., & Ruiz-Larrea, F. (2018). Production and antimicrobial activity of nisin under enological conditions. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01918>

- Ferrer-Gallego, R., Puxeu, M., Nart, E., Martín, L., & Andorrà, I. (2017). Evaluation of Tempranillo and Albariño SO₂-free wines produced by different chemical alternatives and winemaking procedures. *Food Research International*, *102*(September), 647–657. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.046>
- Florinsiah, L., Farida, Z. Y. M., Norfadilah, R., Nurshahirah, N., Norfazlina, N. M., & Suzaina, Z. C. F. (2013). Mutagenicity effect of Hydrocotyle bonariensis extracts in Salmonella/microsome assay. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, *20*(2), 47–50.
- Fracassetti, D., Gabrielli, M., Costa, C., Tomás-Barberán, F. A., & Tirelli, A. (2016). Characterization and suitability of polyphenols-based formulas to replace sulfur dioxide for storage of sparkling white wine. *Food Control*, *60*, 606–614. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.005>
- Fredericks, I. N., du Toit, M., & Krügel, M. (2011). Efficacy of ultraviolet radiation as an alternative technology to inactivate microorganisms in grape juices and wines. *Food Microbiology*, *28*, 510–517.
- Freyssin, A., Page, G., Fauconneau, B., & Rioux Bilan, A. (2020). Natural stilbenes effects in animal models of Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*, *15*(5), 843–849. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.268970>
- Galiniak, S., Aebisher, D., & Bartusik-Aebisher, D. (2019). Health benefits of resveratrol administration. *Acta Biochimica Polonica*, *66*(1), 13–21. <https://doi.org/10.18388/abp.2018.2749>
- Galuska, S., & Makris, D. P. (2013). The effect of chlorogenic acid, catechin and SO₂ on browning development in white wine model solutions. *Journal of the Institute of Brewing*, *119*(4), 309–313. <https://doi.org/10.1002/jib.94>
- Gambini, J., Inglés, M., Olaso, G., Lopez-Grueso, R., Bonet-Costa, V., Gimeno-Mallench, L., Mas-Bargues, C., Abdelaziz, K. M., Gomez-Cabrera, M. C., Vina, J., & Borrás, C. (2015). Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/837042>
- Gambutì, A., Han, G., Peterson, A. L., & Waterhouse, A. L. (2015). Sulfur dioxide and glutathione alter the outcome of microoxygenation. *American Journal of Enology and Viticulture*, *66*(4), 411–423. <https://doi.org/10.5344/ajev.2015.15005>
- Gambutì, A., Picariello, L., Rolle, L., & Moio, L. (2017). Evaluation of the use of sulfur dioxide and glutathione to prevent oxidative degradation of malvidin-3-monoglucoside by hydrogen peroxide in the model solution and real wine. *Food Research International*, *99*, 454–460. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.010>
- Ganesan, K., & Xu, B. (2017). A critical review on polyphenols and health benefits of black soybeans. *Nutrients*, *9*(5), 1–17. <https://doi.org/10.3390/nu9050455>
- García-Ruiz, A., Requena, T., Peláez, C., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M. V., & Martínez-Cuesta, M. C. (2013). Antimicrobial activity of lacticin 3147 against oenological lactic acid bacteria. Combined effect with other antimicrobial agents. *Food Control*, *32*(2), 477–483. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.027>
- García-Ruiz, A., Crespo, J., López-de-Luzuriaga, J. M., Olmos, M. E., Monge, M., Rodríguez-Álfaro, M. P., Martín-Álvarez, P. J., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2015). Novel biocompatible silver nanoparticles for controlling the growth of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in wines. *Food Control*, *50*, 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.09.035>
- Garde-Cerdán, T., López, R., Garijo, P., González-Arenzana, L., Gutiérrez, A. R., López-Alfaro, I., & Santamaría, P. (2014). Application of colloidal silver versus sulfur dioxide during vinification and storage of Tempranillo red wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *20*(1), 51–61. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12050>
- Gerszon, J., Rodacka, A., & Puchała, M. (2014). Antioxidant properties of resveratrol and its protective effects in neurodegenerative diseases. *Advances in Cell Biology*, *2014*(2), 97–117. <https://doi.org/10.2478/acb-2014-0006>
- Gielazyn, M. L., Ringwood, A. H., Piegorsch, W. W., & Stanczyk, S. E. (2003). Detection of oxidative DNA damage in isolated marine bivalve hemocytes using the comet assay and formamidopyrimidine glycosylase (Fpg). *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *542*(1–2), 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.07.010>
- Gil-Sánchez, I., Monge, M., Miralles, B., Armentia, G., Cueva, C., Crespo, J., López de Luzuriaga, J. M., Olmos, M. E., Bartolomé, B., González de Llano, D., & Moreno-Arribas, M. V. (2019). Some new findings on the potential use of biocompatible silver nanoparticles in winemaking. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *51*(2017), 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.04.017>
- Giovannelli, L., Innocenti, M., Santamaria, A. R., Bigagli, E., Pasqua, G., & Mulinacci, N. (2014). Antitumoural activity of viniferin-enriched extracts from Vitis vinifera L. cell cultures. *Natural Product Research*, *28*(22), 2006–2016. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.924935>

- González-Arenzana, L., Portu, J., López, N., Santamaría, P., Gutiérrez, A. R., López, R., & López-Alfaro, I. (2019a). Pulsed Electric Field treatment after malolactic fermentation of Tempranillo Rioja wines: Influence on microbial, physicochemical and sensorial quality. In *Innovative Food Science and Emerging Technologies* (Vol. 51, Issue 2017). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.05.019>
- González-Arenzana, L., López-Alfaro, I., Gutiérrez, A. R., López, N., Santamaría, P., & López, R. (2019b). Continuous pulsed electric field treatments' impact on the microbiota of red Tempranillo wines aged in oak barrels. *Food Bioscience*, 27(October), 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.10.012>
- González-Rompinelli, E. M., Rodríguez-Bencomo, J. J., García-Ruiz, A., Sánchez-Patán, F., Martín-Álvarez, P. J., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2013). A winery-scale trial of the use of antimicrobial plant phenolic extracts as preservatives during wine ageing in barrels. *Food Control*, 33(2), 440–447. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.03.026>
- Gossiau, A. (2016). Assessment of food toxicology. *Food Science and Human Wellness*
- Goutzourelas, N., Stagos, D., Demertzis, N., Mavridou, P., Karterolioti, H., Georgadakis, S., Kerasioti, E., Aligiannis, N., Skaltsounis, L., Statiri, A., Tsioutsouliti, A., Tsatsakis, A. M., Hayes, A. W., & Kouretas, D. (2014). Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells. *Human and Experimental Toxicology*, 33(11), 1099–1112. <https://doi.org/10.1177/0960327114533575>
- Goutzourelas, N., Stagos, D., Spanidis, Y., Liosi, M., Apostolou, A., Priftis, A., Haroutounian, S., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M., & Kouretas, D. (2015). Polyphenolic composition of grape stem extracts affects antioxidant activity in endothelial and muscle cells. *Molecular Medicine Reports*, 12(4), 5846–5856. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4216>
- Gracin, L., Jambrak, A. R., Juretić, H., Dobrović, S., Barukčić, I., Grozdanović, M., & Smoljanić, G. (2016). Influence of high power ultrasound on *Brettanomyces* and lactic acid bacteria in wine in continuous flow treatment. *Applied Acoustics*, 103, 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.apacoust.2015.05.005>
- Guerra-Rivas, C., Vieira, C., Rubio, B., Martínez, B., Gallardo, B., Mantecón, A. R., Lavín, P., & Manso, T. (2016). Effects of grape pomace in growing lamb diets compared with vitamin E and grape seed extract on meat shelf life. *Meat Science*, 116, 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.02.022>
- Guerrero, R.F., & Cantos-Villar, E. (2015). Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review. *Trends in Food Science & Technology*, 42, 1, 27–43. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.11.004>
- Gutiérrez-Escobar, R., Fernández-Marín, M. I., Richard, T., Fernández-Morales, A., Carbú, M., Cebrian-Tarancón, C., Torija, M. J., Puertas, B., & Cantos-Villar, E. (2021). Development and characterization of a pure stilbene extract from grapevine shoots for use as a preservative in wine. *Food Control*, 121. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107684>
- Hamzaoglu, F., Türkyilmaz, M., & Özkan, M. (2018). Effect of SO₂ on sugars, indicators of Maillard reaction, and browning in dried apricots during storage. *Journal of the science of food and agriculture*, 98(13), 4988–4999. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9033>
- Harbertson, J. F., Parpinello, G. P., Heymann, H., & Downey, M. O. (2012). Impact of exogenous tannin additions on wine chemistry and wine sensory character. *Food Chemistry*, 131(3), 999–1008. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.101>
- Heo, J. R., Kim, S. M., Hwang, K. A., Kang, J. H., & Choi, K. C. (2018). Resveratrol induced reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis, and cell cycle arrest in the A375SM malignant melanoma cell line. *International Journal of Molecular Medicine*, 42(3), 1427–1435. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3732>
- Horn, T. L., Cwik, M. J., Morrissey, R. L., Kapetanovic, I., Crowell, J. A., Booth, T. D., & McCormick, D. L. (2007). Oncogenicity evaluation of resveratrol in p53 (+/-) (p53 knockout) mice. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 45(1), 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.07.015>
- Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., Zipkin, R. E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L. L., Scherer, B., & Sinclair, D. A. (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425(6954), 191–196. <https://doi.org/10.1038/nature01960>
- Huo, X., Zhang, T., Meng, Q., Li, C., & You, B. (2019). Resveratrol Effects on a Diabetic Rat Model with Coronary Heart Disease. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 25, 540–546. <https://doi.org/10.12659/MSM.910996>
- Hynes G, 2007. Resveratrol rat micronucleus test. DSM Nutritional Products Ltd., Basel, Switzerland. DNO 0015/063572. Huntingdon Life Sciences Limited, 25 May 2007.
- Inglés, M., Gambini, J., Carnicero, J. A., García-García, F. J., Rodríguez-Mañas, L., Olaso-González, G., Dromant, M., Borrás, C., & Viña, J. (2014). Oxidative stress is related to frailty, not to age or sex, in a geriatric

- population: lipid and protein oxidation as biomarkers of frailty. *Journal of the American Geriatrics Society*, 62(7), 1324–1328. <https://doi.org/10.1111/jgs.12876>
- Iwuchukwu, O. F., Tallarida, R. J., & Nagar, S. (2011). Resveratrol in combination with other dietary polyphenols concomitantly enhances antiproliferation and UGT1A1 induction in Caco-2 cells. *Life sciences*, 88(23–24), 1047–1054. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.03.016>
- Izquierdo-Cañas, P. M., García-Romero, E., Huertas-Nebreda, B., & Gómez-Alonso, S. (2012). Colloidal silver complex as an alternative to sulphur dioxide in winemaking. *Food Control*, 23(1), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.014>
- Jackowetz, J. N., & Mira de Orduña, R. (2013). Survey of SO₂ binding carbonyls in 237 red and white table wines. *Food Control*, 32(2), 687–692. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.02.001>
- Jamali, H.R., Steel, C.C., & Mohammadi, E. (2020). Wine research and its relationship with wine production: a scientometric analysis of global trends. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12422>
- Jeon, Y., Kwak, S. S., Cheong, S. A., Seong, Y. H., & Hyun, S. H. (2013). Effect of Trans- ϵ -viniferin on in vitro porcine oocyte maturation and subsequent developmental competence in preimplantation embryos. *Journal of Veterinary Medical Science*, 75(10), 1277–1286. <https://doi.org/10.1292/jvms.12-0105>
- Jeong, M. H., Yang, K., Lee, C. G., Jeong, D. H., Park, Y. S., Choi, Y. J., Kim, J. S., Oh, S. J., Jeong, S. K., & Jo, W. S. (2014). In vitro genotoxicity assessment of a novel resveratrol analogue, HS-1793. *Toxicological Research*, 30(3), 211–220. <https://doi.org/10.5487/TR.2014.30.3.211>
- Johnson, W. D., Morrissey, R. L., Osborne, A. L., Kapetanovic, I., Crowell, J. A., Muzzio, M., & McCormick, D. L. (2011). Subchronic oral toxicity and cardiovascular safety pharmacology studies of resveratrol, a naturally occurring polyphenol with cancer preventive activity. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 49(12), 3319–3327. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.08.023>
- Ju, J., Lu, G., Lambert, J. D., & Yang, C. S. (2007). Inhibition of carcinogenesis by tea constituents. *Seminars in cancer biology*, 17(5), 395–402. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2007.06.013>
- Kapetanovic, I. M., Muzzio, M., Huang, Z., Thompson, T. N., & McCormick, D. L. (2011). Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 68(3), 593–601. <https://doi.org/10.1007/s00280-010-1525-4>
- Katalinić, V., Možina, S. S., Skroza, D., Generalić, I., Abramović, H., Miloš, M., Ljubenković, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinc, P., & Boban, M. (2010). Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry*, 119(2), 715–723. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.019>
- Khan, Z. A., Iqbal, A., & Shahzad, S. A. (2017). Synthetic approaches toward stilbenes and their related structures. *Molecular Diversity*, 21(2), 483–509. <https://doi.org/10.1007/s11030-017-9736-9>
- Kim, H. J., Chang, E. J., Bae, S. J., Shim, S. M., Park, H. D., Rhee, C. H., Park, J. H., & Choi, S. W. (2002). Cytotoxic and antimutagenic stilbenes from seeds of *Paeonia lactiflora*. *Archives of pharmacal research*, 25(3), 293–299. <https://doi.org/10.1007/BF02976629>
- Kim, J., Min, J. S., Kim, D., Zheng, Y. F., Mailar, K., Choi, W. J., Lee, C., & Bae, S. K. (2017). A simple and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for trans- ϵ -viniferin quantification in mouse plasma and its application to a pharmacokinetic study in mice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 134, 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.11.044>
- Kirkland, D., Pfuhrer, S., Tweats, D., Aardema, M., Corvi, R., Darroudi, F., Elhajouji, A., Glatt, H., Hastwell, P., Hayashi, M., Kasper, P., Kirchner, S., Lynch, A., Marzin, D., Maurici, D., Meunier, J. R., Müller, L., Nohynek, G., Parry, J., ... White, P. (2007). How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 628(1), 31–55. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.11.008>
- Kirkland, D., Reeve, L., Gatehouse, D., & Vanparys, P. (2011). A core in vitro genotoxicity battery comprising the Ames test plus the in vitro micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and in vivo genotoxins. *Mutation research*, 721(1), 27–73. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.12.015>
- Kowalczyk, M. C., Walaszek, Z., Kowalczyk, P., Kinjo, T., Hanausek, M., & Słaga, T. J. (2009). Differential effects of several phytochemicals and their derivatives on murine keratinocytes in vitro and in vivo: implications for skin cancer prevention. *Carcinogenesis*, 30(6), 1008–1015. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp069>
- Kurin, E., Mućaji, P., & Nagy, M. (2012). In vitro antioxidant activities of three red wine polyphenols and their mixtures: An interaction study. *Molecules*, 17(12), 14336–14348. <https://doi.org/10.3390/molecules171214336>

- Kuršvietienė, L., Stanevičienė, I., Mongirdienė, A., & Bernatoniene, J. (2016). Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. *Medicina (Lithuania)*, 52(3), 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.medic.2016.03.003>
- Lambri, M., Torchio, F., Colangelo, D., Río Segade, S., Giacosa, S., De Faveri, D. M., Gerbi, V., & Rolle, L. (2015). Influence of different berry thermal treatment conditions, grape anthocyanin profile, and skin hardness on the extraction of anthocyanin compounds in the colored grape juice production. *Food Research International*, 77, 584–590. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.027>
- Lantto, T. A., Colucci, M., Zavadová, V., Hiltunen, R., & Raasmaja, A. (2009). Cytotoxicity of curcumin, resveratrol and plant extracts from basil, juniper, laurel and parsley in SH-SY5Y and CV1-P cells. *Food Chemistry*, 117(3), 405–411. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.018>
- Li, F., Chen, G., Zhang, B., & Fu, X. (2017). Current applications and new opportunities for the thermal and non-thermal processing technologies to generate berry product or extracts with high nutraceutical contents. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 100(Pt 2), 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.035>
- Li, H., Guo, A., & Wang, H. (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry*, 108, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.065>
- Li, L., Qiu, R. L., Lin, Y., Cai, Y., Bian, Y., Fan, Y., & Gao, X. J. (2018). Resveratrol suppresses human cervical carcinoma cell proliferation and elevates apoptosis via the mitochondrial and p53 signaling pathways. *Oncology Letters*, 15(6), 9845–9851. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8571>
- Li, X., Wang, P., Wu, D., & Lu, J. (2014). Effects of sterilization temperature on the concentration of ethyl carbamate and other quality traits in Chinese rice wine. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(4), 512–515. <https://doi.org/10.1002/jib.169>
- Li, Y., Jiang, X., Hao, J., Zhang, Y., & Huang, R. (2019). Tea polyphenols: application in the control of oral microorganism infectious diseases. *Archives of oral biology*, 102, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.03.027>
- Li, Z., Yang, X., Dong, S., & Li, X. (2012). DNA breakage induced by piceatannol and copper (II): Mechanism and anticancer properties. *Oncology Letters*, 3(5), 1087–1094. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.597>
- Liburdi, K., Benucci, I., & Esti, M. (2014). Lysozyme in Wine: An Overview of Current and Future Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 1062–1073. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12102>
- Likhtenshtein, G. (2012). Further Reading Modern Arylation Methods Catalytic Asymmetric Friedel-Crafts Alkylations Handbook of Synthetic Photochemistry Gold Chemistry. (n.d.).
- Lisanti, M.T., Blaiotta, G., Nioi, C., & Moio, L. (2019). Alternative Methods to SO2 for Microbiological Stabilization of Wine. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18, 455–479. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12422>
- Liu, T., Qi, H., Ma, L., Liu, Z., Fu, H., Zhu, W., Song, T., Yang, B., & Li, G. (2015). Resveratrol Attenuates Oxidative Stress and Extends Life Span in the Annual Fish *Nothobranchius guentheri*. *Rejuvenation research*, 18(3), 225–233. <https://doi.org/10.1089/rej.2014.1618>
- Liu, T., Liu, M., Guo, Q., Liu, Y., Zhao, Y., Wu, Y., Sun, B., Wang, Q., Liu, J., & Han, J. (2020). Investigation of binary and ternary systems of human serum albumin with oxyresveratrol/piceatannol and/or mitoxantrone by multipectroscopy, molecular docking and cytotoxicity evaluation. *Journal of Molecular Liquids*, 311, 113364. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113364>
- Llana-Ruiz-Cabello, M., Gutiérrez-Praena, D., Puerto, M., Pichardo, S., Jos, Á., & Cameán, A. M. (2015). In vitro pro-oxidant/antioxidant role of carvacrol, thymol and their mixture in the intestinal Caco-2 cell line. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 29(4), 647–656. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.02.006>
- Lluís, L., Muñoz, M., Rosa Nogués, M., Sánchez-Martos, V., Romeu, M., Giral, M., Valls, J., & Solà, R. (2011). Toxicology evaluation of a procyanidin-rich extract from grape skins and seeds. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6), 1450–1454. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.03.042>
- Lombardi, G., Vannini, S., Blasi, F., Marcotullio, M. C., Dominici, L., Villarini, M., Cossignani, L., & Moretti, M. (2015). In vitro safety/protection assessment of resveratrol and pterostilbene in a human hepatoma cell line (HepG2). *Natural Product Communications*, 10(8), 1403–1408. <https://doi.org/10.1177/1934578x1501000823>
- López, N., Puértolas, E., Hernández-Orte, P., Álvarez, I., & Raso, J. (2009). Effect of a pulsed electric field treatment on the anthocyanins composition and other quality parameters of Cabernet Sauvignon freshly fermented model wines obtained after different maceration times. *LWT - Food Science and Technology*, 42(7), 1225–1231. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.03.009>
- López-Giral, N., González-Arenzana, L., González-Ferrero, C., López, R., Santamaría, P., López-Alfaro, I., & Garde-Cerdán, T. (2015). Pulsed electric field treatment to improve the phenolic compound

- extraction from Graciano, Tempranillo and Grenache grape varieties during two vintages. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 28, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.01.003>
- Lorenz, P., Roychowdhury, S., Engelmann, M., Wolf, G., & Horn, T. F. W. (2003). Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: Effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 9(2), 64–76. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2003.09.005>
- Lou, B. S., Wu, P. S., Hou, C. W., Cheng, F. yin, & Chen, J. K. (2014). Simultaneous quantification of trans-resveratrol and its sulfate and glucuronide metabolites in rat tissues by stable isotope-dilution UPLC-MS/MS analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 94, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.01.039>
- Lu, J., Ho, C. T., Ghai, G., & Chen, K. Y. (2001). Resveratrol analog, 3, 4, 5, 4'-tetrahydroxystilbene, differentially induces pro-apoptotic p53/Bax gene expression and inhibits the growth of transformed cells but not their normal counterparts. *Carcinogenesis*, 22(2), 321–328. <https://doi.org/10.1093/carcin/22.2.321>
- Lucera, A., Costa, C., Marinelli, V., Saccotelli, M. A., Del Nobile, M. A., & Conte, A. (2018). Fruit and vegetable by-products to fortify spreadable cheese. *Antioxidants*, 7(5). <https://doi.org/10.3390/antiox7050061>
- Luo, H., Schmid, F., Grbin, P. R., & Jiranek, V. (2012). Viability of common wine spoilage organisms after exposure to high power ultrasonics. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(3), 415–420. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.06.009>
- Lustrato, G., Alfano, G., Belli, C., Grazia, L., Iorizzo, M., Maiuro, L., Massarella, F., Zanardini, E., & Ranalli, G. (2003). Controlling grape must fermentation in early winemaking phases: the role of electrochemical treatment. *Journal of applied microbiology*, 95(5), 1087–1095. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02057.x>
- Lustrato, G., Alfano, G., Belli, C., Grazia, L., Iorizzo, M., & Ranalli, G. (2006). *Scaling-up in industrial winemaking using low electric current as an alternative to sulfur dioxide addition*. 101(Anderson 1994), 682–690. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02931.x>
- Lustrato, G., Vigentini, I., De Leonardis, A., Alfano, G., Tirelli, A., Foschino, R., & Ranalli, G. (2010). Inactivation of wine spoilage yeasts *Dekkera bruxellensis* using low electric current treatment (LEC). *Journal of Applied Microbiology*, 109(2), 594–604. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04686.x>
- Mahadevan, B., Snyder, R.D., Waters, M.D., Benz, R.D., Kemper, R.A., Tice, R.R., & Richard, A.M. (2011). Genetic toxicology in the 21st century: reflections and future directions. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 52, 339–354. <https://doi.org/10.1002/em.20653>
- Mainente, F., Simonato, B., Pasini, G., Franchin, C., Arrigoni, G., & Rizzi, C. (2017). Hen egg white lysozyme is a hidden allergen in Italian commercial ciders. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 34(2), 145–151. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1265673>
- Maisanaba, S., Guzmán-Guillén, R., Puerto, M., Gutiérrez-Praena, D., Ortuño, N., & Jos, Á. (2018). In vitro toxicity evaluation of new silane-modified clays and the migration extract from a derived polymer-clay nanocomposite intended to food packaging applications. *Journal of hazardous materials*, 341, 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.08.003>
- Makong, Y. S., Happi, G. M., Djouaka Bavoua, J. L., Wansi, J. D., Nahar, L., Waffo, A. F. K., Martin, C., Sewald, N., & Sarker, S. D. (2019). Cytotoxic Stilbenes and Canthinone Alkaloids from *Brucea antidysenterica* (Simaroubaceae). *Molecules*, 24(23), 1–10. <https://doi.org/10.3390/molecules24234412>
- Malayoğlu, H. B. (2010). Biberiyenin (*Rosmarinus officinalis* L.) Antioksidan Etkisi. *Hayvansal Üretim*, 51(2), 59–67.
- Malik, R., & Sibraa, D. (2005). Thiamine deficiency due to sulphur dioxide preservative in 'pet meat'--a case of déjà vu. *Australian veterinary journal*, 83(7), 408–411. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2005.tb13076.x>
- Manca, M. L., Marongiu, F., Castangia, I., Catalán-Latorre, A., Caddeo, C., Bacchetta, G., Ennas, G., Zaru, M., Fadda, A. M., & Manconi, M. (2016). Protective effect of grape extract phospholipid vesicles against oxidative stress skin damages. *Industrial Crops and Products*, 83, 561–567. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.069>
- Maner, S., Sharma, A. K., & Banerjee, K. (2017). Wheat Flour Replacement by Wine Grape Pomace Powder Positively Affects Physical, Functional and Sensory Properties of Cookies. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 87(1), 109–113. <https://doi.org/10.1007/s40011-015-0570-5>
- Marel, A. K., Lizard, G., Izard, J. C., Latruffe, N., & Delmas, D. (2008). Inhibitory effects of trans-resveratrol analogs molecules on the proliferation and the cell cycle progression of human colon tumoral cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(5), 538–548. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700185>

- Maron, D. M., & Ames, B. N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation research*, 113(3-4), 173–215. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9)
- Martínez Salgado, M. M., Ortega Blu, R., Janssens, M., & Fincheira, P. (2019). Grape pomace compost as a source of organic matter: Evolution of quality parameters to evaluate maturity and stability. *Journal of Cleaner Production*, 216, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.01.156>
- Matsuoka, A., Furuta, A., Ozaki, M., Fukuhara, K., & Miyata, N. (2001). Resveratrol, a naturally occurring polyphenol, induces sister chromatid exchanges in a Chinese hamster lung (CHL) cell line. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 494(1–2), 107–113. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00184-X](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00184-X)
- Memariani, T., Hosseini, T., Kamali, H., Mohammadi, A., Ghorbani, M., Shakeri, A., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M., & Shahsavand, S. (2016). Evaluation of the cytotoxic effects of *Cyperus longus* extract, fractions and its essential oil on the PC3 and MCF7 cancer cell lines. *Oncology letters*, 11(2), 1353–1360. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.4050>
- Mena, S., Ortega, A., & Estrela, J. M. (2009). Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1–2), 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.09.017>
- Mendonza, L.M., Fernández de Ullivarri, M.F., & Raya, R. (2018). A closer look at Grapes, Wines and winemaking. Chapter 6: *Saccharomyces cerevisiae*: A key yeast for the wine-making process.
- Miranda, M. T., Arranz, J. I., Román, S., Rojas, S., Montero, I., López, M., & Cruz, J. A. (2011). Characterization of grape pomace and pyrenean oak pellets. *Fuel Processing Technology*, 92(2), 278–283. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2010.05.035>
- Mizuno, C. S., Ampomaah, W., Mendonça, F. R., Andrade, G. C., da Silva, A. M. N., Goulart, M. O., & dos Santos, R. A. (2017). Cytotoxicity and genotoxicity of stilbene derivatives in CHO-K1 and HepG2 cell lines. *Genetics and Molecular Biology*, 40(3), 656–664. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0214>
- Može Bornšek, Š. Polak, T., Skrt, M., Demšar, L., Poklar Ulrih, N., & Abram, V. (2015). Effects of industrial and home-made spread processing on bilberry phenolics. *Food Chemistry*, 173, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.005>
- Mughal, A., Vikram, A., Ramarao, P., & Jena, G. B. (2010). Micronucleus and comet assay in the peripheral blood of juvenile rat: establishment of assay feasibility, time of sampling and the induction of DNA damage. *Mutation research*, 700(1-2), 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.05.014>
- Müller, C., Ullmann, K., Wilkens, A., Winterhalter, P., Toyokuni, S., & Steinberg, P. (2009). Potent antioxidative activity of vineatrol@30 grapevine-shoot extract. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73(8), 1831–1836. <https://doi.org/10.1271/bbb.90213>
- Murias, M., Jäger, W., Handler, N., Erker, T., Horvath, Z., Szekeres, T., Nohl, H., & Gille, L. (2005). Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: Structure-activity relationship. *Biochemical Pharmacology*, 69(6), 903–912. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.12.001>
- Mutlu, E., Gibbs, S. T., South, N., Pierfelice, J., Burbach, B., Germolec, D., & Waidyanatha, S. (2020). Comparative toxicokinetics of Trans-resveratrol and its major metabolites in Harlan Sprague Dawley rats and B6C3F1/N mice following oral and intravenous administration. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 394(March), 114962. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.114962>
- Nieto-Rojo, R., Luquin, A., & Ancín-Azpilicueta, C. (2015). Improvement of wine aromatic quality using mixtures of lysozyme and dimethyl dicarbonate, with low SO₂ concentration. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 32(12), 1965–1975. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1094831>
- Nonomura, S., Kanagawa, H., & Makimoto, A. (1963). "Chemical constituents of polygonaceous plants. I. Studies on the components of Ko-J O-Kon. (*Polygonum Cuspidatum* Sieb. Et Zucc.)," *Yakugaku Zasshi*, 83, 988–990.
- Notas, G., Nifli, A. P., Kampa, M., Vercauteren, J., Kouroumalis, E., & Castanas, E. (2006). Resveratrol exerts its antiproliferative effect on HepG2 hepatocellular carcinoma cells, by inducing cell cycle arrest, and NOS activation. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1760(11), 1657–1666. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.09.010>
- Nunes, C., Maricato, É., Cunha, Â., Rocha, M. A. M., Santos, S., Ferreira, P., Silva, M. A., Rodrigues, A., Amado, O., Coimbra, J., Silva, D., Moreira, A., Mendo, S., Lopes Da Silva, J. A., Pereira, E., Rocha, S. M., & Coimbra, M. A. (2016). Chitosan-genipin film, a sustainable methodology for wine preservation. *Green Chemistry*, 18(19), 5331–5341. <https://doi.org/10.1039/c6gc01621a>
- OCDE. (2008). Guideline for the Testing of Chemicals 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents, pp 1-13

- OCDE. (2014). Guideline for the Testing of Chemical 474: Mammalian erythrocyte micronucleus test, pp 1-21.
- OCDE. (2016). Guideline for the Testing of Chemical 489: *In Vivo* Mammalian Alkaline Comet Assay, pp. 1-27.
- OCDE. (2016). Guideline for the Testing of Chemicals 487: *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test, pp 1-23.
- OCDE. (2018). Guideline for the Testing of Chemicals 408: Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents, pp 1-10.
- OCDE. (2018). Guideline for the Testing of Chemicals 451: Carcinogenicity Studies, pp 1-15.
- OCDE. (2018). Guideline for the Testing of Chemicals 452: Chronic Toxicity Studies, pp 1-18.
- OCDE. (2018). Guideline for the Testing of Chemicals 453: Combined Chronic Toxicity/ Carcinogenicity Studies, pp 1-20.
- OCDE. (2020). Guideline for the Testing of Chemicals 471: Bacterial Reverse Mutation Test, pp. 1-11.
- OCDE. (2020). Guideline for the Testing of Chemicals 488: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays, pp 1-18
- OIV. (2019). Statistical Report on World Vitiviniculture. *2019 Statistical Report on World Vitiviniculture*, 23. <http://www.oiv.int/public/medias/5029/world-vitiviniculture-situation-2016.pdf>
- OIV. (2019b). International Code of Oenological Practices. In *International Organisation of Vine and Wine* (Vol. 33, Issue January 2019).
- OIV. (2020). International Code of Oenological Practices. In *International Organisation of Vine and Wine* (Vol. 33, Issue July 2019).
- Oliveira, C.M., Silva Ferreira, A.C., De Freitas, V., & Silva, A.M. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44, 1115-1126. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.050>
- Ortega-Heras, M., Pérez-Magariño, S., & González-Sanjosé, M.L. (2012). Comparative study of the use of maceration enzymes and cold pre-fermentative maceration on phenolic and anthocyanic composition and colour of a Mencía red wine. *LWT - Food Science and Technology*, 48, 1, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.03.012>
- Ovesná, Z., Kozics, K., Bader, Y., Saiko, P., Handler, N., Erker, T., & Szekeres, T. (2006). Antioxidant activity of resveratrol, piceatannol and 3, 3', 4, 4', 5, 5'-hexahydroxy-trans-stilbenein three leukemia cell lines. *Oncology Reports*, 16(3), 617-624. <https://doi.org/10.3892/or.16.3.617>
- Özdemir, F., Apaydin, E., Önder, N. İ., Şen, M., Ayrım, A., Ögünç, Y., & İncesu, Z. (2018). Apoptotic effects of ε-viniferin in combination with cis-platin in C6 cells. *Cytotechnology*, 70(3), 1061-1073. <https://doi.org/10.1007/s10616-018-0197-5>
- Palomera-Ávalos, V., Griñán-Ferré, C., Izquierdo, V., Camins, A., Sanfeliu, C., & Pallàs, M. (2017). Metabolic Stress Induces Cognitive Disturbances and Inflammation in Aged Mice: Protective Role of Resveratrol. *Rejuvenation Research*, 20(3), 202-217. <https://doi.org/10.1089/rej.2016.1885>
- Panero, L., Motta, S., Petrozziello, M., Guaita, M., & Bosso, A. (2014). Effect of SO₂, reduced glutathione and ellagitannins on the shelf life of bottled white wines. *European Food Research and Technology*, 240(2), 345-356. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2334-5>
- Pascariu, S.M., Pop, I.M., Simeanu, D., Pavel, G., & Solcan, C. (2017). Effects of Wine By-Products on Growth Performance, Complete Blood Count and Total Antioxidant Status in Broilers. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 19, 2, 191-2020. <http://doi.org/10.1590/1806-9061-2016-0305>
- Pascual, O., Vignault, A., Gombau, J., Navarro, M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Canals, J. M., Hermosín-Gutierrez, I., Teissedre, P. L., & Zamora, F. (2017). Oxygen consumption rates by different oenological tannins in a model wine solution. *Food Chemistry*, 234, 26-32. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.148>
- Pati, S., Crupi, P., Benucci, I., Antonacci, D., Di Luccia, A., & Esti, M. (2014). HPLC-DAD-MS/MS characterization of phenolic compounds in white wine stored without added sulfite. *Food Research International*, 66, 207-215.
- Pazos, M., Gallardo, J. M., Torres, J. L., & Medina, I. (2005). Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chemistry*, 92(3), 547-557. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.07.036>
- Peinado, R.A., Moreno, J., Bueno, J.E., Moreno, J.A., & Mauricio, J.C. (2004). Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chemistry*, 84, 585-590. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00282-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00282-6)
- Petrova, B., Cartwright, Z. M., & Edwards, C. G. (2016). Effectiveness of chitosan preparations against *Brettanomyces bruxellensis* grown in culture media and red wines. *Journal International Des Sciences de La Vigne et Du Vin*, 50(1), 49-56. <https://doi.org/10.20870/oenone.2016.50.1.54>
- Pezzuto, J. M. (2019). Resveratrol: Twenty years of growth, development and controversy. *Biomolecules and Therapeutics*, 27(1), 1-14. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2018.176>

- Pignitter, M., Schueller, K., Burkon, A., Knorr, V., Esefelder, L., Doberer, D., Wolzt, M., & Somoza, V. (2016). Concentration-dependent effects of resveratrol and metabolites on the redox status of human erythrocytes in single-dose studies. *The Journal of nutritional biochemistry*, *27*, 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.08.032>
- Plataforma tecnológica del vino (2020). Estratégica de Innovación. http://www.ptvino.com/wp-content/uploads/2019/03/aei_2017.pdf
- Plauth, A., Geikowski, A., Cichon, S., Wowro, S. J., Liedgens, L., Rousseau, M., Weidner, C., Fuhr, L., Kliem, M., Jenkins, G., Lotito, S., Wainwright, L. J., & Sauer, S. (2016). Hormetic shifting of redox environment by pro-oxidative resveratrol protects cells against stress. *Free Radical Biology and Medicine*, *99*, 608–622. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.006>
- Privat, C., Telo, J. P., Bernardes-Genisson, V., Vieira, A., Souchard, J. P., & Nepveu, F. (2002). Antioxidant properties of trans-epsilon-viniferin as compared to stilbene derivatives in aqueous and nonaqueous media. *Journal of agricultural and food chemistry*, *50*(5), 1213–1217. <https://doi.org/10.1021/jf010676t>
- Puerto, M., Pichardo, S., Jos, A., & Cameán, A. M. (2009). Oxidative stress induced by microcystin-LR on PLHC-1 fish cell line. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, *23*(8), 1445–1449. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.08.011>
- Puerto, M., Pichardo, S., Jos, A., Prieto, A. I., Sevilla, E., Frías, J. E., & Cameán, A. M. (2010). Differential oxidative stress responses to pure Microcystin-LR and Microcystin-containing and non-containing cyanobacterial crude extracts on Caco-2 cells. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, *55*(2-3), 514–522. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.10.003>
- Qin, G., & Meng, Z. (2009). Effects of sulfur dioxide derivatives on expression of oncogenes and tumor suppressor genes in human bronchial epithelial cells. *Food and Chemical Toxicology*, *47*(4), 734–744. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.01.005>
- Quincozes-Santos, A., Bobermin, L. D., Latini, A., Wajner, M., Souza, D. O., Gonçalves, C. A., & Gottfried, C. (2013). Resveratrol protects C6 astrocyte cell line against hydrogen peroxide-induced oxidative stress through heme oxygenase 1. *PLoS one*, *8*(5), e64372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064372>
- Quiney, C., Dauzonne, D., Kern, C., Fourneron, J. D., Izard, J. C., Mohammad, R. M., Kolb, J. P., & Billard, C. (2004). Flavones and polyphenols inhibit the NO pathway during apoptosis of leukemia B-cells. *Leukemia research*, *28*(8), 851–861. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2003.12.003>
- Quirós, C., Herrero, M., García, L.A., & Díaz, M. (2012). Effects of SO₂ on lactic acid bacteria physiology when used as a preservative compound in malolactic fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, *118*, 89–96. <https://doi.org/10.1002/jib.9>
- Ramos-de-la-Peña, A. M., Renard, C. M. G. C., Montañez, J., de la Luz Reyes-Vega, M., & Contreras-Esquivel, J. C. (2016). A review through recovery, purification and identification of genipin. *Phytochemistry Reviews*, *15*(1), 37–49. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9383-z>
- Raposo, R., Chinnici, F., Ruiz-Moreno, M. J., Puertas, B., Cuevas, F. J., Carbú, M., Guerrero, R. F., Ortíz-Somovilla, V., Moreno-Rojas, J. M., & Cantos-Villar, E. (2018). Sulfur free red wines through the use of grapevine shoots: Impact on the wine quality. *Food chemistry*, *243*, 453–460. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.111>
- Raposo, R., Ruiz-Moreno, M. J., Garde-Cerdán, T., Puertas, B., Moreno-Rojas, J. M., Zafrilla, P., Gonzalo-Diago, A., Guerrero, R. F., & Cantos-Villar, E. (2016a). Replacement of sulfur dioxide by hydroxytyrosol in white wine: Influence on both quality parameters and sensory. *LWT - Food Science and Technology*, *65*, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.005>
- Raposo, R., Ruiz-Moreno, M. J., Garde-Cerdán, T., Puertas, B., Moreno-Rojas, J. M., Gonzalo-Diago, A., Guerrero, R. F., Ortiz, V., & Cantos-Villar, E. (2016b). Effect of hydroxytyrosol on quality of sulfur dioxide-free red wine. *Food Chemistry*, *192*, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.085>
- Raposo, R., Ruiz-Moreno, M. J., Garde-Cerdán, T., Puertas, B., Moreno-Rojas, J. M., Gonzalo-Diago, A., Guerrero, R., Ortiz, V., & Cantos-Villar, E. (2016c). Grapevine-shoot stilbene extract as a preservative in red wine. *Food Chemistry*, *197*, 1102–1111. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.102>
- Rascón, B., Hubbard, B. P., Sinclair, D. A., & Amdam, G. V. (2012). The lifespan extension effects of resveratrol are conserved in the honey bee and may be driven by a mechanism related to caloric restriction. *Aging*, *4*(7), 499–508. <https://doi.org/10.18632/aging.100474>
- Rauf, A., Imran, M., Sulera, H. A. R., Ahmad, B., Peters, D. G., & Mubarak, M. S. (2017). A comprehensive review of the health perspectives of resveratrol. *Food and Function*, *8*(12), 4284–4305. <https://doi.org/10.1039/c7fo01300k>
- Real Decreto (2007). Real Decreto N° 1118/2007, de 24 de agosto, por el que se modifica el Real Decreto 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes

- y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización.
- Rege, S. D., Geetha, T., Griffin, G. D., Broderick, T. L., & Babu, J. R. (2014). Neuroprotective effects of resveratrol in Alzheimer disease pathology. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6(AUG), 1–27. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00218>
- Reglamento (CE). (2004). Directiva N° 2004/10/CE Del Parlamento Europeo Y Del Consejo de 11 de febrero de 2004 sobre la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas relativas a la aplicación de los principios de buenas prácticas de laboratorio y al control de su aplicación para las pruebas sobre las sustancias químicas.
- Reglamento (CE). (2008). N° 1331/2008 Del Parlamento Europeo Y Del Consejo de 16 de diciembre de 2008 por el que se establece un procedimiento de autorización común para los aditivos, las enzimas y los aromas alimentarios.
- Reglamento (CE). (2008). N° 1333/2008 Del Parlamento Europeo Y Del Consejo de 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios.
- Reglamento (UE). (2016). N° 2016/1190 De La Comisión de 19 de julio de 2016 por la que se autoriza la comercialización de trans-resveratrol como nuevo ingrediente alimentario con arreglo al Reglamento (CE) N° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo.
- Reiniso, M., Kårlund, A., Koskela, A., Kaarniranta, K., & Karjalainen, R. O. (2015). Polyphenol stilbenes: Molecular mechanisms of defence against oxidative stress and aging-related diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/340520>
- Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., & Lonvaud, A. (2006) (2nd ed.). *Handbook of enology: The microbiology of wine and vinifications*, Vol. 1 Chichester: Wiley
- Ricci, A., Olejar, K. J., Parpinello, G. P., Mattioli, A. U., Teslić, N., Kilmartin, P. A., & Versari, A. (2016). Antioxidant activity of commercial food grade tannins exemplified in a wine model. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 33(12), 1761–1774. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1241901>
- Renaud, S. C., & de Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339, 1523e1526
- Rimando, A. M., Kalt, W., Magee, J. B., Dewey, J., & Ballington, J. R. (2004). Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in Vaccinium berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4713–4719. <https://doi.org/10.1021/jf040095e>
- Rizzotti, L., Levav, N., Fracchetti, F., Felis, G. E., & Torriani, S. (2015). Effect of UV-C treatment on the microbial population of white and red wines, as revealed by conventional plating and PMA-qPCR methods. *Food Control*, 47, 407–412. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.052>
- Rodríguez, K., Ah-Hen, K. S., Vega-Gálvez, A., Vásquez, V., Quispe-Fuentes, I., Rojas, P., & Lemus-Mondaca, R. (2016). Changes in bioactive components and antioxidant capacity of maqui, *Aristotelia chilensis* [Mol] Stuntz, berries during drying. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 537–542. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.050>
- Rodríguez-García, C., Sánchez-Quesada, C., Gaforio, J. J., & Gaforio, J. J. (2019). Dietary flavonoids as cancer chemopreventive agents: An updated review of human studies. *Antioxidants*, 8(5), 1–23. <https://doi.org/10.3390/antiox8050137>
- Rohaiza, S., Yaacob, W. A., Din, L. B., & Nazlina, I. (2011). Cytotoxic oligostilbenes from *shorea hopeifolia*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(10), 1272–1277. <https://doi.org/10.5897/AJPP10.386>
- Rossi, M., Caruso, F., Antonioletti, R., Viglianti, A., Traversi, G., Leone, S., Basso, E., & Cozzi, R. (2013). Scavenging of hydroxyl radical by resveratrol and related natural stilbenes after hydrogen peroxide attack on DNA. *Chemico-Biological Interactions*, 206(2), 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.09.013>
- Rubio-Bretón, P., Garde-Cerdán, T., & Martínez, J. (2018). Use of Oak Fragments during the Aging of Red Wines. Effect on the Phenolic, Aromatic, and Sensory Composition of Wines as a Function of the Contact Time with the Wood. *Beverages*, 4(4), 102. <https://doi.org/10.3390/beverages4040102>
- Rubiolo, J. A., Mithieux, G., & Vega, F. V. (2008). Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. *European journal of pharmacology*, 591(1-3), 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.06.067>
- Ruiz-Moreno, M. J., Raposo, R., Moreno-Rojas, J. M., Zafrilla, P., Cayuela, J. M., Mulero, J., Puertas, B., Guerrero, R.F., Piñeiro, Z., & Cantos-Villar, E. (2015). Efficacy of olive oil mill extract in replacing sulfur dioxide in wine model. *LWT - Food Science and Technology*, 61, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.024>

- Sáez, V., Pastene, E., Vergara, C., Mardones, C., Hermosín-Gutiérrez, I., Gómez-Alonso, S., Gómez, M. V., Theoduloz, C., Riquelme, S., & von Baer, D. (2018). Oligostilbenoids in *Vitis vinifera* L. Pinot Noir grape cane extract: Isolation, characterization, in vitro antioxidant capacity and anti-proliferative effect on cancer cells. *Food Chemistry*, 265(December 2017), 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.050>
- Salaha, M. I., Kallithraka, S., Marmaras, I., Koussissi, E., & Tzourou, I. (2008). A natural alternative to sulphur dioxide for red wine production: Influence on colour, antioxidant activity and anthocyanin content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(8), 660–666. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.03.010>
- Sánchez-Alonso, I., Borderías, J., Larsson, K., & Undeland, I. (2007). Inhibition of hemoglobin-mediated oxidation of regular and lipid-fortified washed cod mince by a white grape dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5299–5305. <https://doi.org/10.1021/jf0702242>
- Santos, M. C., Nunes, C., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2012). Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: Review of their potentialities and limitations. *European Food Research and Technology*, 234(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1614-6>
- Santos, M. C., Nunes, C., Cappelle, J., Gonçalves, F. J., Rodrigues, A., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2013). Effect of high pressure treatments on the physicochemical properties of a sulphur dioxide-free red wine. *Food Chemistry*, 141(3), 2558–2566. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.022>
- Santos, M. C., Nunes, C., Jourdes, M., Teissedre, P. L., Rodrigues, A., Amado, O., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2016). Evaluation of the potential of high pressure technology as an enological practice for red wines. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 33, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.11.018>
- Sarubbo, F., Tejada, S., Esteban, S., Jimenez-García, M., & Moranta, D. (2020). Resveratrol, SIRT1, oxidative stress, and brain aging. *Aging*, 319–326. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818698-5.00033-x>
- Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free radical biology & medicine*, 30(11), 1191–1212. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(01\)00480-4](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00480-4)
- Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., & Bitsch, R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free radical research*, 36(2), 177–187. <https://doi.org/10.1080/10715760290006411>
- Schmitt, E., Lehmann, L., Metzler, M., & Stopper, H. (2002). Hormonal and genotoxic activity of resveratrol. *Toxicology Letters*, 136(2), 133–142. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00290-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00290-4)
- Serra, A. T., Matias, A. A., Nunes, A. V. M., Leitão, M. C., Brito, D., Bronze, R., Silva, S., Pires, A., Crespo, M. T., San Romão, M. V., & Duarte, C. M. (2008). In vitro evaluation of olive- and grape-based natural extracts as potential preservatives for food. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(3), 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.07.011>
- Ševcech, J., Vicenová, L., Furdíková, K., & Malík, F. (2015). Influence of thermal treatment on polyphenol extraction of wine cv. André. *Czech Journal of Food Sciences*, 33(1), 91–96. <https://doi.org/10.17221/286/2014-CJFS>
- Shaito, A., Posadino, A. M., Younes, N., Hasan, H., Halabi, S., Alhababi, D., Al-Mohannadi, A., Abdel-Rahman, W. M., Eid, A. H., Nasrallah, G. K., & Pintus, G. (2020). Potential adverse effects of resveratrol: A literature review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6). <https://doi.org/10.3390/ijms21062084>
- Shen, T., Wang, X. N., & Lou, H. X. (2009). Natural stilbenes: An overview. *Natural Product Reports*, 26(7), 916–935. <https://doi.org/10.1039/b905960a>
- Siedlecka-Kroplewska, K., Ślebioda, T., & Kmiec, Z. (2019). Induction of autophagy, apoptosis and acquisition of resistance in response to piceatannol toxicity in MOLT-4 human leukemia cells. *Toxicology in Vitro*, 59(January), 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.03.040>
- Silva, P., Sureda, A., Tur, J. A., Andreoletti, P., Cherkaoui-Malki, M., & Latruffe, N. (2019). How efficient is resveratrol as an antioxidant of the Mediterranean diet, towards alterations during the aging process?. *Free radical research*, 53(sup1), 1101–1112. <https://doi.org/10.1080/10715762.2019.1614176>
- Silva, V., Igrejas, G., Falco, V., Santos, T. P., Torres, C., Oliveira, A. M. P., Pereira, J. E., Amaral, J. S., & Poeta, P. (2018). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of phenolic compounds extracted from wine industry by-products. *Food Control*, 92, 516–522. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.031>
- Sirerol, J. A., Rodríguez, M. L., Mena, S., Asensi, M. A., Estrela, J. M., & Ortega, A. L. (2016). Role of natural stilbenes in the prevention of cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3128951>

- Sokolowski A, 2012. Salmonella Typhimurium Reverse Mutation Assay, Harlan CCR GmbH, Study No. 1465800. 28 September 2012.
- Sonni, F., Bastante, M. J. C., Chinnici, F., Natali, N., & Riponi, C. (2009). Replacement of sulfur dioxide by lysozyme and oenological tannins during fermentation: Influence on volatile composition of white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(4), 688–696. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3503>
- Sonni, F., Clark, A. C., Prenzler, P. D., Riponi, C., & Scollary, G. R. (2011). Antioxidant action of glutathione and the ascorbic acid/glutathione pair in a model white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3940–3949. <https://doi.org/10.1021/jf104575w>
- Stagos, D., Spanou, C., Margariti, M., Stathopoulos, C., Mamuris, Z., Kazantzoglou, G., Magiatis, P., & Kouretas, D. (2007). Cytogenetic effects of grape extracts (*Vitis vinifera*) and polyphenols on mitomycin C-induced sister chromatid exchanges (SCEs) in human blood lymphocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5246–5252. <https://doi.org/10.1021/jf0635255>
- Su, D., Cheng, Y., Liu, M., Liu, D., Cui, H., Zhang, B., Zhou, S., Yang, T., & Mei, Q. (2013). Comparison of Piceid and Resveratrol in Antioxidation and Antiproliferation Activities In Vitro. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054505>
- Surh, Y. J., & Ferguson, L. R. (2003). Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential--highlights of a symposium. *Mutation research*, 523-524, 1–8. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(02\)00343-3](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(02)00343-3)
- Tak, J. K., Lee, J. H., & Park, J. W. (2012). Resveratrol and piperine enhance radiosensitivity of tumor cells. *BMB reports*, 45(4), 242–246. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2012.45.4.242>
- Takaoka, M.J. (1940). Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loe. fil.). *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University*, 3, 1-16
- Tao, Y., Sun, D. W., Górecki, A., Błaszczak, W., Lamparski, G., Amarowicz, R., Fornal, J., & Jeliński, T. (2012). Effects of high hydrostatic pressure processing on the physicochemical and sensorial properties of a red wine. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 409–416. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.09.005>
- Tatefuji, T., Yanagihara, M., Fukushima, S., & Hashimoto, K. (2014). Safety assessment of melinjo (*Gnetum gnemon* L.) seed extract: Acute and subchronic toxicity studies. *Food and Chemical Toxicology*, 67, 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.02.030>
- Thomas, A., Ranadive, N., Nayak, H., Surendran, S., Nampoothiri, M., Mudgal, J., & Nayak, Y. (2016). In vitro cytotoxicity activity of chrysin, morin and resveratrol against MCF-7 breast cancer cell lines. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 13(3), 1633–1637. <https://doi.org/10.13005/bbra/2310>
- Tian, B., & Liu, J. (2020). Resveratrol: a review of plant sources, synthesis, stability, modification and food application. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(4), 1392–1404. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10152>
- Tremel, J., Leláková, V., Šmejkal, K., Paulíčková, T., Labuda, Š., Granica, S., Havlík, J., Jankovská, D., Padrtová, T., & Hošek, J. (2019). Antioxidant activity of selected stilbenoid derivatives in a cellular model system. *Biomolecules*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/biom9090468>
- Türkez, H., & Sisman, T. (2012). The genoprotective activity of resveratrol on aflatoxin B₁-induced DNA damage in human lymphocytes in vitro. *Toxicology and industrial health*, 28(5), 474–480. <https://doi.org/10.1177/0748233711414614>
- Valenzano, D. R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L., & Cellerino, A. (2006). Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Current biology: CB*, 16(3), 296–300. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.12.038>
- Valera, M. J., Sainz, F., Mas, A., & Torija, M. J. (2017). Effect of chitosan and SO₂ on viability of *Acetobacter* strains in wine. *International Journal of Food Microbiology*, 246, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.022>
- Vally, H., & Thompson, P. J. (2001). Role of sulfite additives in wine induced asthma: single dose and cumulative dose studies. *Thorax*, 56(10), 763–769. <https://doi.org/10.1136/thorax.56.10.763>
- Vally, H., Misso, N. L. A., & Madan, V. (2009). Clinical effects of sulphite additives. *Clinical & Experimental Allergy*, 39(11), 1643–1651. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03362.x>
- Versari, A., Du Toit, W., & Parpinello, G. P. (2013). Oenological tannins: A review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 19(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12002>
- Wang, C., Wheeler, C. T., Alberico, T., Sun, X., Seeberger, J., Laslo, M., Spangler, E., Kern, B., de Cabo, R., & Zou, S. (2013). The effect of resveratrol on lifespan depends on both gender and dietary nutrient composition in *Drosophila melanogaster*. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 35(1), 69–81. <https://doi.org/10.1007/s11357-011-9332-3>

- Webber, V., Dutra, S. V., Spinelli, F. R., Carnieli, G. J., Cardozo, A., & Vanderlinde, R. (2017). Effect of glutathione during bottle storage of sparkling wine. *Food Chemistry*, 216, 254–259. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.042>
- Werner, M., Rauhut, D., & Cottureau, P. (2005). Yeasts and Natural Production of Sulphites. Extraído de “Cuestiones Técnicas” del Código De Buenas Prácticas Vitivinícolas Ecológicas, elaborado por el proyecto EU FP6 STREP – ORWINE
- Williams, L. D., Burdock, G. A., Edwards, J. A., Beck, M., & Bausch, J. (2009). Safety studies conducted on high-purity trans-resveratrol in experimental animals. *Food and Chemical Toxicology*, 47(9), 2170–2182. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.06.002>
- Wittenauer, J., Mäckle, S., Sußmann, D., Schweiggert-Weisz, U., & Carle, R. (2015). Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity. *Fitoterapia*, 101, 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.01.005>
- Wu, C. W., Nakamoto, Y., Hisatome, T., Yoshida, S., & Miyazaki, H. (2020). Resveratrol and its dimers ϵ -viniferin and δ -viniferin in red wine protect vascular endothelial cells by a similar mechanism with different potency and efficacy. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 36(7), 535–542. <https://doi.org/10.1002/kjm2.12199>
- Wu, P., Cai, C., Shen, X., Wang, L., Zhang, J., Tan, Y., Jiang, W., & Pan, X. (2014). Formation of ethyl carbamate and changes during fermentation and storage of yellow rice wine. *Food Chemistry*, 152, 108–112. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.135>
- Xu, C., Yagiz, Y., Marshall, S., Li, Z., Simonne, A., Lu, J., & Marshall, M. R. (2015). Application of muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.) pomace extract to reduce carcinogenic acrylamide. *Food Chemistry*, 182, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.133>
- Xu, Y., Burton, S., Kim, C., & Sismour, E. (2016). Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial properties of pomace extracts from four virginia-grown grape varieties. *Food Science and Nutrition*, 4(1), 125–133. <https://doi.org/10.1002/fsn3.264>
- Xue, E. X., Lin, J. P., Zhang, Y., Sheng, S. R., Liu, H. X., Zhou, Y. L., & Xu, H. (2017). Pterostilbene inhibits inflammation and ROS production in chondrocytes by activating Nrf2 pathway. *Oncotarget*, 8(26), 41988–42000. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16716>
- Xue, Y. Q., Di, J. M., Luo, Y., Cheng, K. J., Wei, X., & Shi, Z. (2014). Resveratrol oligomers for the prevention and treatment of cancers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/765832>
- Yamakoshi, J., Saito, M., Kataoka, S., & Kikuchi, M. (2002). Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Food and Chemical Toxicology*, 40(5), 599–607. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00006-6](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00006-6)
- Yang, J. S., Tongson, J., Kim, K.-H., & Park, Y. (2020). Piceatannol attenuates fat accumulation and oxidative stress in steatosis-induced HepG2 cells. *Current Research in Food Science*, 3, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2020.03.008>
- Yang, N., Huang, K., Lyu, C., & Wang, J. (2016). Pulsed electric field technology in the manufacturing processes of wine, beer, and rice wine: A review. *Food Control*, 61, 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.022>
- Yáñez, M., Fraiz, N., Cano, E., & Orallo, F. (2006). (-)-Trans- ϵ -viniferin, a polyphenol present in wines, is an inhibitor of noradrenaline and 5-hydroxytryptamine uptake and of monoamine oxidase activity. *European Journal of Pharmacology*, 542(1–3), 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.06.005>
- Yildirim, K.H., & Darici, B. (2020). Alternative Methods Of Sulfur Dioxide Used In Wine Production. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9, 4, 675–687. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.9.4.675-687>
- Yousef, M., Vlachogiannis, I. A., & Tsiani, E. (2017). Effects of resveratrol against lung cancer: In vitro and in vivo studies. *Nutrients*, 9(11), 1–14. <https://doi.org/10.3390/nu9111231>
- Zamora, F. (2005). Anhídrido sulfuroso: reflexiones sobre este aditivo en el vino. *Enologos*, 38.
- Zghonda, N., Yoshida, S., Araki, M., Kusunoki, M., Mliki, A., Ghorbel, A., & Miyazaki, H. (2011). Greater effectiveness of ϵ -viniferin in red wine than its monomer resveratrol for inhibiting vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 75(7), 1259–1267. <https://doi.org/10.1271/bbb.110022>
- Zghonda, N., Yoshida, S., Ezaki, S., Otake, Y., Murakami, C., Mliki, A., Ghorbel, A., & Miyazaki, H. (2012). ϵ -Viniferin is more effective than its monomer resveratrol in improving the functions of vascular endothelial cells and the heart. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 76(5), 954–960. <https://doi.org/10.1271/bbb.110975>

- Zhang, S., Ma, Y., & Feng, J. (2020). Neuroprotective mechanisms of ϵ -viniferin in a rotenone-induced cell model of Parkinson's disease: Significance of SIRT3-mediated FOXO3 deacetylation. *Neural Regeneration Research*, 15(11), 2143–2153. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.282264>
- Zheng, L. F., Wei, Q. Y., Cai, Y. J., Fang, J. G., Zhou, B., Yang, L., & Liu, Z. L. (2006). DNA damage induced by resveratrol and its synthetic analogues in the presence of Cu (II) ions: Mechanism and structure-activity relationship. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(12), 1807–1816. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.09.007>
- Zironi, R., Comuzzo, P., Tat, L., & Scobioala, S. (2009). Gestión Del SO₂ en la enología de bajo impacto ambiental. Extraído de “Cuestiones Técnicas” del Código De Buenas Prácticas Vitivinícolas Ecológicas, elaborado por el proyecto EU FP6 STREP – ORWINE

