



TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA

Determinación de compuestos bioactivos en subproductos de vinificación

Autor: Jesús de la Escalera Rodríguez

Tutora: María José Jara Palacios

Departamento: Química Analítica

Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

1 de febrero de 2021

Resumen.

En este trabajo se ha evaluado la extracción de compuestos fenólicos presentes en las distintas partes del orujo (semilla, hollejo y raspón), principal subproducto de la vinificación, de la variedad de uva Zalema, mediante una extracción sólido-líquido convencional a temperatura ambiente. Se han utilizado tres disolventes diferentes (agua, etanol y una mezcla al 50 % agua/etanol) para comparar su rendimiento de extracción y las características de los extractos fenólicos obtenidos. Se ha determinado su contenido fenólico total (TPC), mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu, y la concentración de determinados compuestos de manera individual, mediante UHPLC. También se han evaluado algunas actividades biológicas de los extractos en ensayos *in vitro*. La actividad antioxidante se ha determinado mediante la capacidad para neutralizar el radical DPPH frente al antioxidante estándar Trolox. La actividad anticolinesterasa se ha determinado por el método de Ellman.

La mezcla de agua y etanol al 50 % resultó ser el disolvente con mayor capacidad de extracción respecto al TPC en los tres subproductos y para la mayoría de los compuestos individuales, con alguna excepción como el ácido gálico en semilla, que se extrajo mejor con agua. La semilla se situó como el subproducto con mayor TPC, seguido del raspón y, por último, del hollejo (9829,86, 3745,77 y 2797,67 mg GAE/100 g, respectivamente, en agua/etanol). La semilla destacó por su elevado contenido de flavanoles (en el extracto de agua/etanol: epicatequina 40,02, catequina 33,04 y procianidina B1 29,36 mg/100 g) y de ácido gálico (41,45 mg/100 g en agua). El hollejo presentó la mayor cantidad de flavonoles (quercetina-3-*O*-glucósido 48,85 mg/100 g en el extracto agua/etanol). El raspón presentó cantidades elevadas, pero inferiores a la semilla o el hollejo, para todos los grupos fenólicos (procianidina B1 28,33 y quercetina-3-*O*-glucósido 45,05 mg/100 g en agua/etanol).

La actividad antioxidante de los extractos siguió una correlación lineal con su TPC, con la excepción de los extractos hidroalcohólicos de hollejo y raspón. El raspón presentó una actividad antioxidante menor a la del hollejo (28,10 frente a 34,96 mmol TE/100 g), probablemente debido al mayor contenido en flavonoles del hollejo. El extracto de semilla con agua/etanol mostró la mayor actividad (50,44 mmol TE/100 g). La actividad anticolinesterasa se midió con una concentración de 2,5 mg/mL en todos los extractos. Los mayores porcentajes de inhibición se alcanzaron con los extractos de etanol y agua/etanol de semilla (53,9 y 48,9 %) y los extractos en agua/etanol de raspón y hollejo (45,2 y 39,9 %, respectivamente).

Los resultados indicaron que los subproductos de vinificación de uva blanca son una buena fuente de compuestos fenólicos con elevada actividad antioxidante y de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa.

Palabras clave: subproductos de vinificación, compuestos fenólicos, antioxidante, colinesterasa.

Abstract.

In the present work, extraction of phenolic compounds found in the different parts of the grape pomace (seeds, skins and stalks), the main wine-making by-product, from grape variety Zalema, has been carried out by means of a conventional solid-liquid extraction at room temperature. Three different solvents (water, ethanol and 50% water/ethanol mixture) have been used to compare the extraction yield and the characteristics of the extracts. Later, its total phenolic content (TPC) has been determined through Folin-Ciocalteu assay, and the concentration of certain individual compounds, by UHPLC. Some biological activities have also been evaluated in *in vitro* tests. Antioxidant capacity has been determined by the ability of the extracts to scavenge DPPH radical against the standard antioxidant Trolox. Anticholinesterase activity has been measured by the Ellman's method.

Water/ethanol mixture turned out to be the solvent with the highest extraction efficacy with respect to TPC in the three by-products and for most of the individual compounds, with some exceptions like gallic acid in the seeds, which was better extracted with water. The seed was ranked as the by-product with the highest TPC in its three extracts, followed by the stalk and, finally, the skin (9829.86, 3745.77 and 2797.67 mg GAE/100 g, respectively, in water/ethanol). The seed stood out for its high content of flavanols (in the water / ethanol extract: epicatechin 40.02, catechin 33.04 and procyanidin B1 29.36 mg/100 g) and gallic acid (41.45 mg/100 g in water). The skins presented the highest amount of flavonols (quercetin-3-O-glucoside 48.85 mg/100 g in the water/ethanol extract). The stalk showed high amounts, but lower than the seed or the skin, for all phenolic groups (procyanidin B1 28.33 and quercetin-3-O-glucoside 45.05 mg/100 g in water/ethanol).

The antioxidant activity of the extracts followed a linear correlation with their TPC, except for the hydroalcoholic extracts of skin and stalk. The latter, despite presenting higher TPC, obtained a lower antioxidant activity (28.10 vs 34.96 mmol TE/100 g), probably due to the higher flavonol content of the skin. The seed extract in water/ethanol showed the highest activity (50.44 mmol TE/100 g). The anticholinesterase activity was measured with the extracts standardized at a concentration of 2.5 mg/mL. The highest percentages of inhibition were achieved with the ethanol and water/ethanol seed extracts (53.9 and 48.9 %) and the water/ethanol extracts from stalk and skin (45.2 and 39.9 %).

Results indicated that white wine-making by-products are a good source of phenolic compounds with high antioxidant power and ability to inhibit the enzyme acetylcholinesterase.

Keywords: wine-making by-product, phenolic compounds, antioxidant, cholinesterase

Índice

1. Introducción	5
1.1. Compuestos bioactivos	6
1.2. Subproductos de vinificación	7
1.3. Compuestos fenólicos en subproductos de vinificación	10
1.3.1. Compuestos fenólicos	10
▪ Clasificación según su estructura química	10
▪ Actividades biológicas	11
1.3.2. Factores de variabilidad en la composición fenólica de subproductos	13
1.3.3. Metodología analítica	15
▪ Tratamiento de la materia prima	15
▪ Extracción fenólica	15
▪ Metodología de determinación fenólica	16
▪ Metodología de evaluación de la actividad antioxidante	17
2. Objetivos del TFG y plan de trabajo	17
3. Metodología	18
3.1. Materiales, equipos y reactivos	18
3.2. Muestras	19
3.3. Extracción fenólica	19
3.4. Contenido fenólico total (TPC)	20
3.5. Determinación de compuestos fenólicos individuales	21
3.6. Evaluación de la actividad antioxidante	21
3.7. Evaluación de la actividad anticolinesterasa	22
3.8. Análisis estadístico	22
4. Resultados y discusión	23
4.1. Contenido fenólico total (TPC)	23
4.2. Determinación de compuestos fenólicos individuales	23
4.3. Evaluación de la actividad antioxidante	28
4.4. Evaluación de la actividad anticolinesterasa	29
5. Conclusiones	31
Bibliografía	32

1. Introducción.

La vid (*Vitis vinifera* L.) es una de las plantas más cultivadas alrededor del mundo, cuyo fruto, la uva, se utiliza en la elaboración de una de las bebidas alcohólicas más consumidas, el vino. En el año 2018, se obtuvieron 77,8 millones de toneladas de uva en todo el mundo, de los que el 57 % fueron destinadas a la vinificación, con un volumen total de 292 millones de hectolitros de vino producido. España es el país que alberga la mayor superficie mundial de viñedo, con casi un millón de hectáreas destinadas a este cultivo, lo que representa el 13 % de la superficie total. Más del 95% de la uva cosechada en este país se utiliza para obtener vino, con una producción de 44,4 millones de hectolitros en el año 2018 (OIV, 2019). En la Unión Europea se produce el 65 % del vino a nivel mundial, con Italia, Francia y España a la cabeza. Es una actividad cultural y económica de gran peso en la UE, con un mercado que mueve miles de millones de euros y que no deja de crecer año tras año (Eurostat Comext, 2018).

La industria agroalimentaria es responsable de generar un importante y perjudicial impacto ecológico y la industria vitivinícola, por extensión, también tiene su parte de contribución al problema. Este sector se caracteriza por la estacionalidad, ya que la mayor parte de su actividad se lleva a cabo durante el periodo de vendimia. En consecuencia, se producen enormes cantidades de residuos en un plazo muy corto de tiempo, lo cual dificulta una gestión adecuada de estos. Debido a los elevados costes de gestión, una buena parte de los residuos acaban siendo incinerados, depositados en vertederos o esparcidos por el terreno, especialmente aquellos provenientes de pequeñas explotaciones (Christ y Burritt, 2013; Ruggieri et al., 2009). Los residuos vitivinícolas tienen un elevado impacto en la calidad del suelo cuando son depositados sin tratamiento previo, debido, a su pH ácido y a la elevada presencia de compuestos fenólicos, que presentan propiedades fitotóxicas y antimicrobianas (Bustamante et al., 2008).

La legislación española (Ley 22/2011, de 28 de Julio, de Residuos y Suelos Contaminados, 2011) obliga a la industria a adoptar medidas para reducir al máximo la producción de residuos y a prepararlos para la reutilización y el reciclaje. Con ello, la citada ley define el concepto de subproducto como *“sustancia u objeto obtenida de manera integrante en un proceso de producción, cuyo principal objetivo no es la producción de dicha sustancia, y que se tiene la seguridad de que será utilizado ulteriormente sin tener impactos adversos en la salud humana o el medio ambiente”*. Asimismo, define la valorización de residuos como *“aquellas operaciones destinadas a otorgar al residuo una finalidad útil en la economía, al sustituir a otros materiales que de otro modo se hubiesen empleado para dicha utilidad, y dándole valor a una sustancia que, de no ser por dicha operación, hubiese sido desechada”*. Estos conceptos se engloban en

el marco de la economía circular o bioeconomía, un modelo productivo basado en optimizar el uso y a alargar y cerrar los ciclos de vida de los recursos y materiales utilizados para proveer bienes y servicios en todos los sectores económicos de un modo ecológicamente sostenible (Wohlgemuth et al., 2021). Actualmente, la implementación de este modelo económico es una de las mayores prioridades de los organismos públicos a nivel internacional (Comisión Europea, 2019; ONU, 2015).

Se han investigado numerosas opciones para la valorización económica de los subproductos de la vinificación. Una de las más prometedoras, y que va creciendo cada año, es la recuperación de compuestos bioactivos, por sus numerosas aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética (Fontana et al., 2013). Desde hace unas décadas se habla de los efectos saludables del vino y sus componentes químicos, principalmente los compuestos fenólicos. Hoy en día existe una extensa literatura sobre estos compuestos y su relación con la salud humana, que será tratada en el presente trabajo.

Este tema cobra una gran relevancia por la creciente concienciación de la ciudadanía sobre la importancia de la alimentación saludable y el respeto al medio ambiente, y la influencia que ello tiene en el comportamiento de los consumidores (Barber et al., 2009). Ambas cuestiones suponen un valor añadido al producto, y así lo demuestra el interés de las bodegas y asociaciones de viticultores por las certificaciones oficiales de viñedos y vinos ecológicos (di Vita et al., 2019); de la industria alimentaria en el etiquetado de alimentos como orgánicos, sin aditivos, con propiedades funcionales, etc. (Moons et al., 2018; Oraman, 2014); o de la industria farmacéutica y cosmética en la elaboración de productos naturales o a base de plantas (Patra et al., 2018).

En este trabajo se obtendrán extractos ricos en compuestos bioactivos mediante métodos de extracción ecológicos, sencillos y de bajo coste a partir de subproductos de vinificación de la variedad de uva Zalema, de gran importancia en la región de la Denominación de Origen del Condado de Huelva. Posteriormente, se determinará su composición química y se evaluarán sus propiedades bioactivas, concretamente la actividad antioxidante y anticolinesterasa.

1.1. Compuestos bioactivos.

Un compuesto bioactivo se define como cualquier compuesto químico obtenido de fuentes vegetales, animales o microbiológicas que presentan una actividad biológica en el organismo que lo consume y repercute favorablemente en su salud. Presentan una gran diversidad

estructural y funcional. La gran mayoría de ellos no aportan ningún valor nutricional esencial, ya que no participan directamente en el metabolismo energético y estructural. A pesar de ello, tienen una gran relevancia en la alimentación por sus propiedades. Aunque existen algunos péptidos, glúcidos y lípidos con actividad biológica propia, el grueso de estos compuestos corresponde a fitoquímicos, productos del metabolismo secundario de las plantas (Fernandes et al., 2018; Patil et al., 2009).

Estos metabolitos pueden tener funciones muy diferentes en las plantas, muchas de ellas aún desconocidas. Gran parte de ellas son mecanismos de interacción con el entorno, ya sea como atrayente de animales e insectos (colores, esencias, etc.), protección frente a herbívoros, parásitos y microorganismos (sabores desagradables, toxinas, etc.), protección frente a la radiación solar y la oxidación o mediadores de procesos alelopáticos, es decir, de relación con otras plantas. Según su estructura, y rutas biosintéticas, se distinguen 3 grandes grupos: compuestos fenólicos, alcaloides y terpenoides. Dentro de cada uno existe una gran variedad de subgrupos y compuestos, así como diversas propiedades biológicas y aplicaciones: principios activos de medicamentos, fitosanitarios, herbicidas, insecticidas, aditivos alimentarios, cosméticos, perfumes y un largo etcétera (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Por lo general, estos compuestos se producen en una cantidad muy pequeña y con una gran variabilidad. Algunos compuestos son muy comunes en el reino vegetal y otros están restringidos a determinadas familias, especies e incluso a variedades concretas. También influyen otros factores como, por ejemplo, las condiciones ambientales, el grado de maduración de la planta y otros procesos fisiológicos y patológicos.

1.2. Subproductos de vinificación.

La industria vitivinícola se encarga del cultivo de la vid (*Vitis vinifera* L.) y de la producción del vino, generando una gran cantidad de residuos y subproductos a lo largo de todo el proceso. La vinificación se define como el conjunto de operaciones llevadas a cabo para convertir el mosto, o zumo de la uva, en vino. Durante la vinificación se generan subproductos como el orujo, los lodos de aguas residuales y las lías o heces del vino. Cada uno de ellos se obtiene en diferentes fases del proceso, como muestra la Fig. 1.

Los lodos son residuos semisólidos generados a partir de las aguas residuales procedentes de labores de limpieza. Aunque contienen ciertas cantidades de alcohol o tartratos, su extracción es poco rentable, por lo que son residuos de poco valor y de cuya gestión suelen encargarse

empresas externas. Sus posibles usos son compostaje y fermentación anaeróbica para la producción de biogás (Moletta, 2005; Ruggieri et al., 2009).

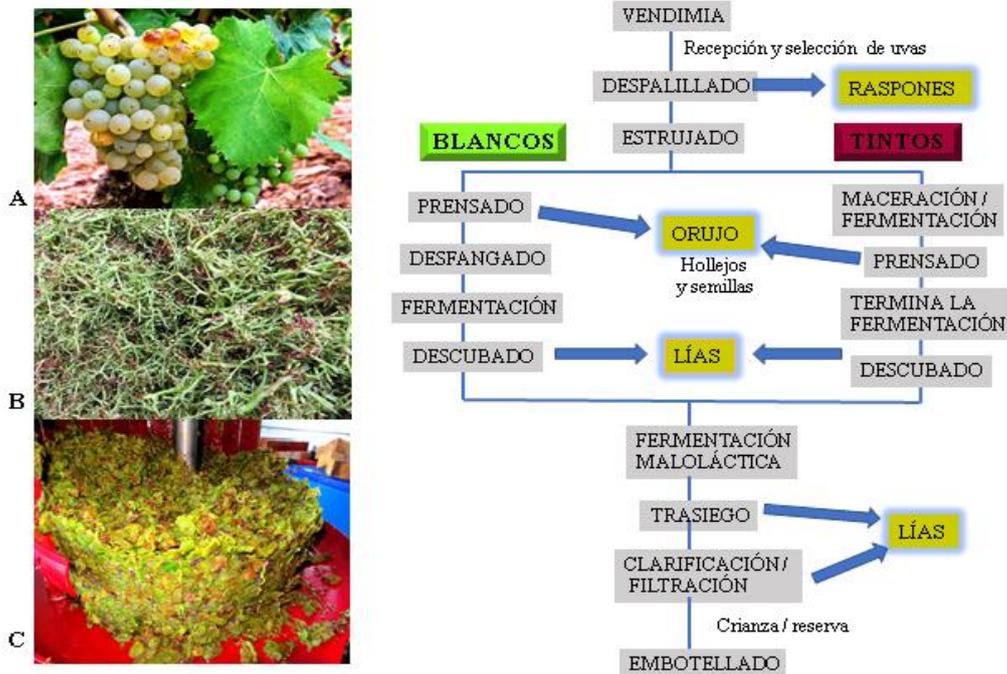


Figura 1. Etapas del proceso de vinificación y obtención de subproductos (OIV, 2016). A. Racimo de uvas blancas en la vid; B. Raspones después del despallado; C. Orujo de uvas blancas prensado. Fuente de las imágenes: <https://urbinavinos.blogspot.com>

Las lías, o heces del vino, son residuos sólidos depositados al fondo de los recipientes durante la fermentación y el almacenamiento o precipitadas tras operaciones como la clarificación y otros procesos autorizados. Están formadas, principalmente, por restos de levaduras y otros microorganismos y por materia inorgánica (Pérez-Serradilla y Luque de Castro, 2008). Su principal destino es la extracción de alcohol y tartratos o el compostaje. También destacan sus propiedades nutricionales, que convierte a las lías en un gran suplemento para medios de cultivo de microorganismos (Dimou et al., 2015) y la capacidad que tienen de eliminar del vino sustancias indeseables, como micotoxinas (Moruno et al., 2005).

El orujo es el principal subproducto de la vinificación, suponiendo hasta el 25 % del peso de la uva recibida y más del 75 % del peso de subproductos totales generados. El orujo es la materia sólida resultante del estrujado de la uva, separada del mosto y prensada para que quede todo su jugo en él. Se pueden diferenciar varios componentes en el orujo: el hollejo, o piel de la uva, que representa entre el 45 y el 50 % de su peso; semillas o pepitas, 25-30 %; raspones, que son la estructura leñosa de los racimos, 25-30 %; restos de pulpa del interior del fruto. La proporción

de cada elemento varía en función de la variedad de la uva, las condiciones de cultivo y el proceso de vinificación (Ruggieri et al., 2009).

Como puede observarse en la Fig. 1, las etapas del proceso pueden variar según el tipo de vino que se pretende obtener, y con ello, también variará la composición del orujo. En la vinificación en blanco, el orujo se separa y se prensa al inicio, antes de comenzar la fermentación. Por el contrario, en la vinificación en tinto se realiza una maceración del orujo en el mosto durante todo el tiempo de fermentación, o gran parte de él, para aportar al vino las características organolépticas típicas del vino tinto, como su intenso color y aroma o el sabor astringente. En ambos casos, blanco y tinto, es una práctica común realizar el despalillado antes de proceder a extraer el mosto de la uva. El despalillado consiste en separar las bayas del escobajo (raspones de un racimo). El estrujado de la uva junto a los raspones aporta al mosto gran cantidad de compuestos que pueden producir un sabor herbáceo o demasiado astringente al vino. En la práctica, es el enólogo el que decide en qué cantidad y durante cuánto tiempo estarán en contacto estas partes sólidas con el mosto (OIV, 2016).

Tradicionalmente, el orujo ha sido muy utilizado para la producción de otras bebidas alcohólicas de alta graduación destilando directamente los orujos fermentados de la vinificación en tinto o con una fermentación previa de los orujos frescos macerados en agua. En España se le llama aguardiente de orujo, o simplemente orujo. En otros países de tradición vinícola tienen diferentes denominaciones: «grappa» en Italia, «bagaceira» en Portugal o «marc» en Francia, término adoptado también por países anglófonos (Silva et al., 2000). El etanol destilado también puede usarse con fines industriales. Otros usos convencionales son la purificación de ácido tartárico (Yalcin et al., 2008), la extracción de aceite de las semillas (Bail et al., 2008) o de antocianinas de la piel (Markakis, 1982).

En menor medida, también se utiliza el orujo como biomasa para la producción de energía y biocombustibles (Cáceres et al., 2012; Celma et al., 2007), como fertilizante por medio del compostaje (Eleonora et al., 2014) o como material de cultivo de microorganismos (Koutinas et al., 2014). Su uso como alimento en explotaciones ganaderas venía decreciendo por su bajo rendimiento nutricional y el exceso de taninos, que retrasa la digestión, reduce la absorción de nutrientes y pueden generar rechazo del animal (Molina-Alcaide et al., 2008). Sin embargo, la suplementación de su dieta normal con orujo o extractos de este en el pienso ha demostrado ser beneficiosa para la calidad de sus productos y la salud de los animales y los consumidores por el aporte de compuestos fenólicos (Guerra-Rivas et al., 2013; Ianni et al., 2019).

Los compuestos fenólicos se vienen investigando y explotando cada vez más en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, ya sea en forma de extractos o de compuestos específicos purificados, debido a sus efectos positivos para la salud y sus propiedades organolépticas, antioxidantes y conservantes. Sus aplicaciones con mayor potencial son el enriquecimiento de alimentos con extractos fenólicos y la elaboración de productos derivados. Una dieta rica en polifenoles repercute favorablemente en la salud del consumidor, ya que presentan numerosas funciones biológicas que se verán más adelante.

1.3. Compuestos fenólicos en subproductos de vinificación.

1.3.1. Compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos son un grupo de compuestos orgánicos muy presentes en todo el reino vegetal. En su estructura se encuentra, al menos, un grupo fenol, es decir, un anillo aromático con un grupo hidroxilo o más. Presentan una enorme variedad química, y cada tipo puede poseer propiedades específicas. Se incorporan en la dieta en grandes cantidades a partir de frutas, verduras y productos derivados. Se les atribuyen numerosas propiedades beneficiosas para el organismo (Haminiuk et al., 2012).

- Clasificación de compuestos fenólicos según su estructura química (Cassidy y Kay, 2012; Garrido y Borges, 2013; Murkovic, 2015; Paredes y Clemente, 2005):

Los compuestos fenólicos se pueden clasificar según su estructura química, variando desde compuestos simples derivados del fenol a polímeros de elevado peso molecular. Entre los más simples (un anillo aromático) se encuentran los **ácidos fenólicos** como: ácidos hidroxibenzoicos (ácido gálico, protocatéquico, gentísico, vanílico y salicílico) y ácidos hidroxicinámicos (ácido cafeico, cumárico, caftárico, ferúlico y clorogénico).

Otro grupo muy amplio es el de los **flavonoides**, cuya característica común es un esqueleto carbonado C6-C3-C6 que forma tres anillos, como puede observarse en la Fig. 2. Presenta varios subgrupos a su vez: flavonas (luteolina y apigenina), flavonoles (quercetina, kaempferol y miricetina), flavan-3-oles (catequina, epicatequina, galocatequina y epigalocatequina), flavanonas (hesperidina y naringenina) isoflavonas (genisteína y daidzeína) y antocianidinas (cianidina, pelargonidina, delphinidina, petunidina y malvinidina).

Los flavanoles pueden formar oligómeros y polímeros de elevado peso molecular llamados proantocianidinas. Las proantocianidinas se clasifican en dos grupos: procianidinas, derivados de catequina y epicatequina, y prodelfinidinas, derivados de galocatequina y epigalocatequina

(González-Neves et al., 2011). También se les conoce como taninos condensados. El concepto de tanino no procede de una clasificación estructural, si no de sus usos históricos como sustancias usadas para curtir («tanner», en francés) las pieles y producir cuero. Este uso se basa en su propiedad de formar complejos y precipitar las proteínas (Khanbabaee y van Ree, 2001). Existe otro grupo de taninos estructuralmente diferentes, los taninos hidrolizables, que se componen de un ácido fenólico simple unido a polialcoholes por enlace glicosídico o éster.

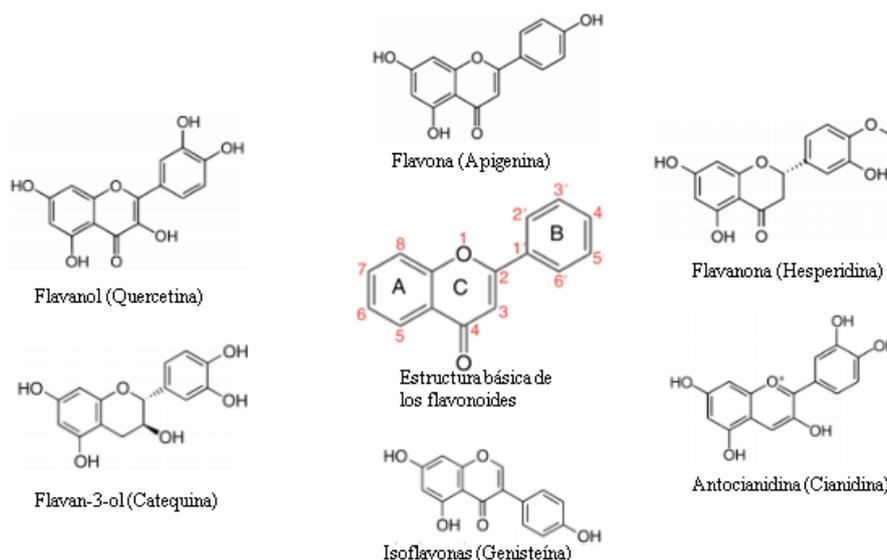


Figura 2. Ejemplos de las diversas clases de flavonoides (Domínguez-Ávila et al., 2017).

Además, existen más compuestos fenólicos que escapan de esta clasificación y que son especialmente relevantes, como los **estilbenoides** (resveratrol, viniferina). Concretamente, el resveratrol es uno de los compuestos más estudiados en el vino tinto por sus numerosos efectos beneficiosos para la salud. Otros compuestos fenólicos, de menor importancia hasta ahora, pero con gran potencial de investigación, son los **lignanos**, productos de la dimerización de alcoholes cinámicos (Soleymani et al., 2020).

- **Actividades biológicas de los compuestos fenólicos:**

Una de sus actividades biológicas más destacadas es la actividad antioxidante. El organismo dispone de diversos sistemas de protección frente a especies químicas oxidantes y radicales libres generados en el metabolismo de nutrientes y xenobióticos, como enzimas (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, etc.), moléculas endógenas (glutatión, coenzima Q, melatonina, etc.) y exógenas (vitaminas A,C y E, carotenoides, etc.). Si la producción de radicales libres sobrepasa estos mecanismos de protección, se alcanza una situación de estrés oxidativo, en la que se suceden reacciones radicalarias sin control, provocando daños en los componentes celulares como proteínas, lípidos y el ADN (Anastasiadi et al., 2010; Pisoschi y Pop, 2015). La

estructura química de los compuestos fenólicos les permite neutralizar radicales libres y actuar como quelantes de metales que catalizan reacciones de formación de estas especies reactivas, como cobre, cobalto, cromo o manganeso (Afanas'ev et al., 1989).

Existen evidencias de que estos daños están relacionados con el envejecimiento acelerado y con numerosos procesos fisiopatológicos crónicos como la aterosclerosis (por peroxidación de lipoproteínas LDL), disfunción endotelial, accidentes cardiovasculares (infarto de miocardio, ictus cerebral, etc.), cáncer, daño hepático (principal órgano donde se lleva a cabo el metabolismo oxidativo de xenobióticos), o enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer o Parkinson), entre otros (Bhat et al., 2015; Halliwell, 2007; Rezzani et al., 2008; Rodríguez y Céspedes, 1999; Scicchitano et al., 2019; Tsutsui et al., 2011; Valko et al., 2007).

La actividad de los compuestos fenólicos contra el cáncer se explica por diversos mecanismos. Su poder antioxidante puede ayudar a prevenir la carcinogénesis evitando daños en el ADN. Pero existen evidencias de mecanismos específicos que confieren actividad antitumoral a determinados compuestos, como el ácido gálico, la quercetina o la naringenina. Estos mecanismos son la inhibición de la proliferación celular, la inducción de la apoptosis, la inhibición de la angiogénesis y la reducción de la inflamación local (Corona et al., 2007; Dihal et al., 2006; Kaur et al., 2009; León-González et al., 2017; Saunders, 2009; Singh et al., 2004).

Estos compuestos también han demostrado actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral, en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Sumado a su actividad antioxidante, convierten a los compuestos fenólicos en un aditivo conservante de origen natural idóneo para la industria alimentaria (Friedman, 2014; Hassan et al., 2019; Olszewska et al., 2020; Yang y Jiang, 2015).

Destacan también sus efectos beneficiosos en el sistema cardiovascular, como reducir la activación plaquetaria y estimular la función endotelial. Esto resulta, además, en una vasodilatación y reducción de la presión arterial, especialmente en personas hipertensas. También han demostrado su eficacia en la prevención y el tratamiento de la aterosclerosis. La reducción de la peroxidación de lipoproteínas LDL evita la formación de placas de ateroma en las paredes arteriales. Pero, además, una dieta rica en polifenoles aumenta la proporción de colesterol HDL. (Erlund et al., 2008; Pérez-Vizcaíno et al., 2006; van Mierlo et al., 2010).

Los polifenoles también presentan propiedades antiinflamatorias, interactuando con determinadas vías de señalización celular y reduciendo la expresión de genes proinflamatorios como los implicados en la vía del ácido araquidónico (síntesis de mediadores inflamatorios a nivel local) o en la producción de citoquinas y reactantes de fase aguda. De esta manera, también cumplen con un papel inmunomodulador que, potencialmente, podría mejorar la

situación de pacientes con enfermedades crónicas relacionadas con un estado proinflamatorio sistémico o local, como la obesidad, la diabetes tipo 2, el asma, bronquitis crónica, procesos de fibrosis, artritis, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas o el cáncer (Athanassiou et al., 2020; Cho et al., 2020; Maleki et al., 2019; Yahfoufi et al., 2018).

Los polifenoles también muestran capacidad para inhibir la enzima acetilcolinesterasa. Esta enzima cataliza la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (ACh) en el espacio sináptico, devolviendo a la neurona a su estado de reposo. Con su inhibición, aumenta la actividad colinérgica en el sistema nervioso central, lo que podría reducir o ralentizar la aparición de síntomas y perturbaciones cognitivas y de conducta en pacientes con Alzheimer. Además, existen estudios que indican la capacidad de los compuestos fenólicos para reducir la formación de agregados de β -amiloide, el principal marcador bioquímico de dicha patología. Su eficacia aún se encuentra en fase de investigación, pero muestra resultados prometedores si se suma al resto de mecanismos previamente descritos por los que previene la neurodegeneración (Costa et al., 2011; di Donato et al., 2018; Jabir et al., 2018; Moss, 2020; Smid et al., 2012).

1.3.2. Factores de variabilidad en la composición fenólica de subproductos.

El perfil fenólico de los subproductos de vinificación depende de una serie de factores intrínsecos y extrínsecos. Entre los primeros se encuentran la variedad de la uva, el material vegetal seleccionado y el grado de maduración en el momento de la vendimia. Entre los extrínsecos, destacan las condiciones edafoclimáticas, es decir, del suelo y del clima, las prácticas agrícolas aplicadas al viñedo, los procedimientos empleados en la vinificación y los aspectos fitosanitarios que pueden afectar a la planta. La multitud de posibilidades que se generan de todos estos factores hace difícil determinar su efecto sobre la composición fenólica final, ya que existe una gran interrelación entre ellos.

La variedad de uva es un factor determinante en el perfil fenólico de la uva, por la diferente afectación del resto de factores a cada variedad. Existen innumerables variedades de uva distintas cultivadas alrededor del mundo, con denominaciones, a veces, confusas por las sinonimias en diferentes países y regiones o por hibridaciones entre ellas. Por ello, es recomendable ceñirse a las variedades determinadas por organismos oficiales (OIV, 2013). En la literatura se encuentran numerosos estudios comparando la composición de uvas, orujo o vino de diferentes variedades (González-Neves et al., 2007; Jara-Palacios et al., 2014; Landrault et al., 2001; Lingua et al., 2016; Mitić et al., 2010).

La composición de los diferentes elementos vegetales también varía de manera considerable. En el caso del orujo, se consideran tres elementos diferenciados: raspones, semillas y hollejos. La mayor cantidad de compuestos fenólicos totales se encuentran en la semilla, en la que abundan los flavan-3-oles (catequina, epicatequina y procianidinas) y los ácidos fenólicos (gálico y protocatéuico). El contenido fenólico total más bajo se encontraría en el hollejo, aunque es en él donde se encuentra la mayor cantidad de flavonoles, principalmente en forma de 3-O-glucósidos, rutósidos, glucurónidos y otros (de quercetina, kaempferol, miricetina, etc.). En el hollejo también hay flavan-3-oles, en cantidad muy inferior a los flavonoles, y ácidos fenólicos. Además, en la piel de uvas tintas se encuentran elevadas cantidades de antocianinas, que no se detectan en otras partes del orujo ni en la uva blanca. Los compuestos fenólicos más abundantes en los raspones son las proantocianidinas, o taninos condensados, seguido de flavanoles y ácidos fenólicos. También contienen flavonoles, en cantidad algo menor al hollejo. Los taninos pueden hallarse en todo el orujo, aunque su contenido y grado de polimerización varía considerablemente entre sus partes. El mayor contenido de taninos se encuentra en los hollejos, así como el mayor grado de polimerización, con una media de 28 monómeros pero que puede incluso superar las 80 unidades de flavanoles. Mientras tanto, el grado de polimerización medio en raspones se encuentra en 9 y en las semillas en 11 unidades. Los ácidos fenólicos también presentan una distribución particular. En la semilla abundan los derivados hidroxibenzoicos, como los galatos o ácido protocatéuico, y no se detectan derivados hidroxicinámicos. En cambio, en el hollejo sí encontramos estos últimos, como los ácidos cutárico y caftárico (Hogervorst et al., 2017; Jara-Palacios et al., 2014; Jara-Palacios et al., 2020; Lavelli et al., 2017; Spigno et al., 2017; Teixeira et al., 2014; Xia et al., 2010).

Respecto al suelo, destacan el nivel hídrico, de pH y de nutrientes (nitrógeno, fósforo, potasio) y la relación de la planta con la microbiota de la rizosfera, que le permite aumentar la disponibilidad de estos nutrientes (Torres et al., 2018). Diversos estudios apuntan a que un ligero déficit hídrico durante la etapa de maduración del fruto acelera dicho proceso y aumenta la producción de compuestos fenólicos (Castellarin et al., 2007). El clima tiene una gran influencia en la calidad de la uva. Los principales factores son la temperatura, la radiación solar y la pluviosidad, los cuales se ven muy afectados por aspectos geográficos como la latitud y la altitud. La radiación solar durante la época de maduración aumenta la cantidad de fenoles totales, aunque una excesiva exposición solar y las altas temperaturas pueden provocar la aparición de quemaduras o la degradación del fruto y, por tanto, pérdida de calidad. Las condiciones climáticas a lo largo del año son la principal causa de los cambios que se dan en las características

de los vinos de una cosecha a otra, aunque se planten las mismas variedades y se realicen las mismas prácticas agrícolas (Downey et al., 2006; Šebela et al., 2017; van Leeuwen et al., 2004).

1.3.3. Metodología analítica.

- Tratamiento de la materia prima:

Son operaciones enfocadas a la mejora de la gestión de los subproductos, la conservación de sus componentes, la homogenización de la muestra y el incremento de la capacidad de extracción de estos compuestos (Drosou et al., 2015; Fontana et al., 2013; Hogervorst et al., 2017). Esto se consigue, generalmente, por medio del secado, la molienda y la congelación. La retirada de su alto contenido acuoso desactiva los mecanismos enzimáticos de degradación, impide su contaminación microbiana y reduce significativamente el peso y volumen de los subproductos, facilitando su manejo. La molienda o pulverización aumenta la capacidad de extracción por parte de los disolventes, al romper la matriz lignocelulósica que atrapa los compuestos y aumentar la superficie de contacto sólido-líquido, y homogeniza la muestra. Otros ejemplos de procedimientos menos convencionales que pueden mejorar el rendimiento de la extracción son la previa digestión enzimática (celulasas, pectinasas) o el uso de agentes químicos (alcalinización), entre otros (Álvarez et al., 2017; Bao et al., 2020; el Achkar et al., 2018).

- Extracción fenólica:

El método más común es la extracción sólido-líquido, es decir, por medio de disolventes. La elección del disolvente, y su cantidad, y las condiciones experimentales como la temperatura, el pH, el tiempo o la agitación determinarán el rendimiento de la extracción. Los compuestos fenólicos tienen una naturaleza polar, por lo que su solubilidad en agua es bastante elevada. No obstante, la combinación del agua con otros disolventes (metanol, etanol, acetona, acetato de etilo, etc.) puede mejorar el rendimiento del proceso, al aumentar la cantidad extraída y reducir el tiempo. El metanol es el que presenta mejores resultados en la extracción de flavan-3-oles y la acetona para las procianidinas. Sin embargo, el uso de estos disolventes está limitado en favor del etanol, que es más económico y también obtiene buenas extracciones, sin presentar los efectos perjudiciales para el organismo y el medio ambiente de los otros compuestos (Fontana et al., 2013; Ignat et al., 2011). Además, con el etanol se maximiza la extracción del contenido fenólico total, siendo la mezcla de agua y etanol al 50 % la más eficiente (Bucić-Kojić et al., 2009).

Otros parámetros importantes son la temperatura y el pH. A mayor temperatura, se obtiene una mejor y más rápida extracción de compuestos fenólicos totales, pero una alta temperatura

durante un largo periodo puede afectar a la estabilidad de estos compuestos y, en consecuencia, reducir la eficacia de la extracción y del poder antioxidante del extracto (Fontana et al., 2017; Spigno et al., 2007). El pH ácido también favorece la extracción, usándose en concentraciones entre el 0.1 y el 1 % de HCl (Vatai et al., 2009).

Se han estudiado multitud de técnicas complementarias para favorecer la cinética de extracción. Las más valoradas son: la extracción asistida por ultrasonidos, por microondas, descargas eléctricas de alto voltaje, calentamiento óhmico, inyección de disolventes a altas presiones y temperatura o la extracción con fluidos supercríticos (Barba et al., 2016; Fontana et al., 2017; Maroun et al., 2017). El fluido supercrítico por excelencia es el CO₂, dado su bajo punto crítico, que permite realizar la extracción a temperaturas entre 30 y 40 °C, y porque no deja rastros en el extracto al evaporarse a presión atmosférica. El CO₂ es una sustancia apolar, por lo que necesita la adición de cosolventes, como el etanol, para extraer los compuestos fenólicos de manera eficiente (Fontana et al., 2017; Ignat et al., 2011; Vatai et al., 2009).

- Metodología de determinación fenólica:

El análisis del contenido fenólico tiene varias consideraciones. En primer lugar, está la determinación del contenido fenólico total (TPC). El método de elección es el ensayo Folin-Ciocalteu, basado en la reducción de un reactivo compuesto por fosfotungstato y fosfomolibdato y la determinación colorimétrica del producto azul resultante, a una longitud de onda de 760-765 nm. El resultado de la prueba se expresa en equivalentes de ácido gálico (GAE). Es un ensayo sencillo y reproducible, pero presenta ciertas limitaciones, ya que el reactivo interacciona con otras especies químicas oxidables como azúcares reductores, ácido ascórbico o aminoácidos aromáticos, así como con proteínas (Malta y Liu, 2014; Singleton et al., 1999).

La determinación individual de compuestos concretos se lleva a cabo por medio de la cromatografía líquida de alta eficacia o resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*). Es un método con una alta sensibilidad y especificidad, basado en el diferente tiempo de retención de cada compuesto en una columna cromatográfica a alta presión. Con un detector y un software que transforme los datos de señal, el ordenador elabora un cromatograma, en el que cada pico representa un compuesto, y su cantidad es directamente proporcional al área bajo la curva del pico. Para identificar cada compuesto, debe compararse con el tiempo de retención de compuestos estándares puros, lo que limita el análisis por la enorme variedad de compuestos fenólicos en la muestra y la disponibilidad comercial de los reactivos. La combinación de la cromatografía con la espectrometría de masas ofrece unos resultados excepcionales (Fontana et al., 2013; Jara-Palacios et al., 2014; Malta y Liu, 2014).

- Metodología de evaluación de la actividad antioxidante:

Existen numerosos métodos para evaluar la capacidad antioxidante de los extractos. El método DPPH toma su nombre del reactivo usado, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, un radical libre relativamente estable con una banda de absorción a 515-517 nm que desaparece al ser neutralizado por una sustancia antioxidante (Brand-Williams et al., 1995). Hay otros métodos que usan diferentes reactivos pero que comparten el mismo fundamento: ABTS, por ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico); FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), que usa un complejo férrico de 2,4,6-tripiridil-S-triazina (TPTZ); TRAP (*Total Reactive Antioxidant Potential*), en el que el reactivo es el dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH). El ensayo ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) también utiliza AAPH acompañado de fluoresceína, y la detección se lleva a cabo por fluorimetría. En todos estos ensayos se utiliza como control positivo el reactivo Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), un análogo hidrosoluble de tocoferoles, que también posee una elevada capacidad antioxidante. Por ello, el resultado de la actividad antioxidante se expresa en equivalentes de Trolox (TE). Estos ensayos *in vitro* presentan la ventaja de ser sencillos, de bajo coste y de alta reproducibilidad, pero no reflejan la capacidad antioxidante *in vivo*, debido a las limitaciones ya mencionadas, como la biodisponibilidad y el metabolismo de estos compuestos en el organismo, o la interferencia de otros componentes celulares. Para ello, se requiere la utilización de otros métodos, como cultivos celulares, tejidos *ex vivo* o, directamente, en ensayos clínicos (Badarinath et al., 2010; Brand-Williams et al., 1995; Malta y Liu, 2014).

2. Objetivos del TFG y plan de trabajo.

El objetivo de este Trabajo Fin de Grado es la obtención de extractos fenólicos con propiedades bioactivas a partir de subproductos de vinificación, mediante el uso de disolventes inocuos.

Para ello, se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- Obtener extractos fenólicos a partir de los constituyentes del orujo: semillas, hollejos y raspones. La extracción se realizará mediante una extracción sólido-líquido convencional, con tres disolventes (agua, etanol y mezcla de agua y etanol al 50 %) , a temperatura ambiente, con agitación y durante un tiempo predeterminado. Se valorará la influencia del disolvente en la composición y la actividad biológica de los extractos.

- Caracterizar químicamente los extractos. En primer lugar, se realizará una determinación del contenido fenólico total, mediante el método de Folin-Ciocalteu. A continuación, los extractos se analizarán por medio de una cromatografía líquida de alta resolución (UHPLC), para la determinación fenólica cualitativa y cuantitativa de los compuestos individuales.
- Evaluar la actividad biológica de los extractos. Por una parte, se determinará la actividad antioxidante de cada extracto, por medio del ensayo DPPH. Por otra parte, se valorará la actividad anticolinesterasa mediante ensayos *in vitro* de la capacidad de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE).

3. Metodología.

3.1. Materiales, equipos y reactivos.

- Metanol y etanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).
- Carbonato de sodio (Na₂CO₃) (VWR, Leuven, Bélgica).
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (VWR, Leuven, Bélgica).
- Ácido fórmico y acetonitrilo para HPLC (Panreac, Barcelona, España).
- Estándares para HPLC: ácido gálico, ácido protocatéquico, catequina, epicatequina y 3-O-rutinósido de quercetina se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Madrid, España); 3-O-glucósidos de quercetina y kaempferol de Extrasynthese (Genay, Francia).
- DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).
- Estándar Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) de Acros Organics (Geel, Alemania).
- Reactivo de Ellman (o DTNB, 5-5'-ditiobis-[ácido 2-nitrobenzoico]), yoduro de acetiltiocolina (ATCI), galantamina y la enzima acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7, tipo VI-S, de anguila eléctrica) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).
- Espectrofotómetro UV-Vis Agilent® 8453 (Agilent Technologies, Palo Alto, EE. UU.).
- Cromatógrafo Agilent 1290 (Agilent Technologies, Palo Alto, EE. UU.) equipado con un detector de matriz de diodos. La columna usada fue una C18 Eclipse Plus 120, con medidas de 50 x 2.1 mm y un tamaño de poros de 1.8 µm.
- Liofilizador.
- Agitador Vortex IKA Genios 3 (IKA®, Staufen, Alemania).
- pH-metro CRISON GLP 21 (Crison Instruments, S.A., Barcelona, España).
- Cubeta de vidrio de 10 mm de camino óptico.

- Cubetas desechables de plástico de 10 mm de camino óptico.
- Micropipetas Eppendorf.
- Matraces aforados de 10, 25, 50, 100, 500 y 1000 mL.

3.2. Muestras.

Las muestras de subproductos de vinificación corresponden a orujo de uva blanca de la variedad de uva Zalema, suministrada por una bodega perteneciente a la Denominación de Origen Condado de Huelva. Los distintos elementos del orujo fueron separados manualmente, obteniendo tres tipos de muestras independientes: semillas, hollejos y raspones, tal como se muestra en la Fig. 3.



Figura 3. Muestra fresca de orujo de vinificación (A) y sus distintas partes separadas: semillas (B), hollejos (C) y raspones (D).

Las muestras se sometieron al siguiente pretratamiento: se lavaron con agua destilada, se liofilizaron durante 24 horas y se molieron hasta obtener un polvo fino y homogéneo, como se muestra en la imagen de la Fig. 4.

3.3. Extracción fenólica.

Los extractos fenólicos se obtuvieron mediante una extracción sólido-líquido convencional, según el método propuesto por Jara-Palacios et al. (Jara-Palacios et al., 2020). Para cada muestra, se partió de una cantidad de 5 g de materia seca y molida, a los que se añadieron 50 mL de disolvente a temperatura ambiente (18-20 °C). El proceso se realizó con 3 disolventes

diferentes: agua, etanol y mezcla al 50 % de agua/etanol y las muestras se pusieron en agitación magnética durante una hora, obteniéndose las mezclas correspondientes (Fig. 4).

Las disoluciones obtenidas se centrifugaron a una fuerza de 4190 g durante 15 minutos. Se recogió el sobrenadante y el sedimento sólido de la muestra se suspendió de nuevo, repitiendo dos ciclos idénticos más. Los sobrenadantes de cada muestra se unieron, obteniendo extractos de 150 mL por muestra y disolvente. Finalmente, cada extracto fue desecado por evaporación a presión reducida, mediante un evaporador rotativo, y almacenado a -20 °C para su correcta conservación hasta el momento del análisis, en el que serían resuspendidos con una cantidad de disolvente necesaria para alcanzar una concentración del orden de 50 mg/mL.

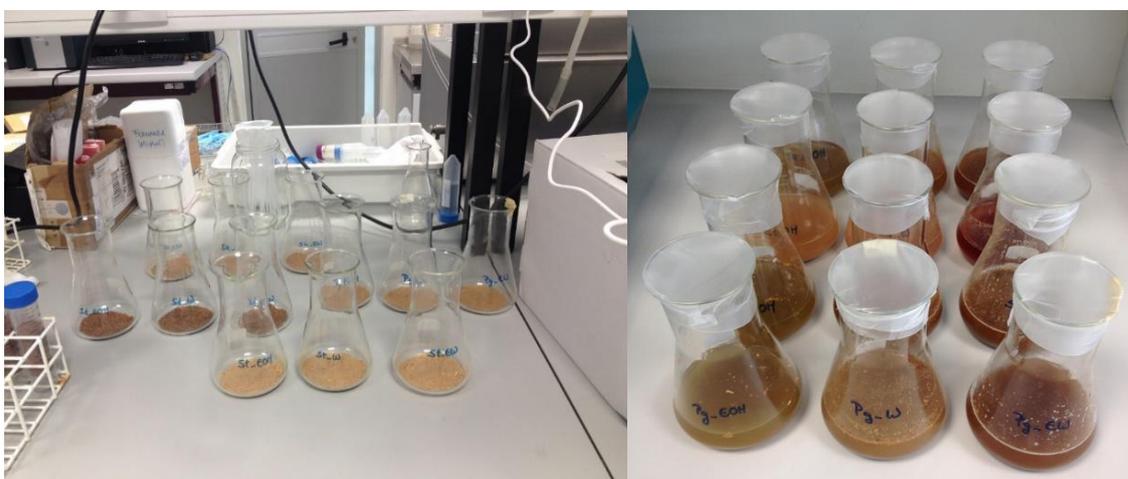


Figura 4. Muestras de semillas, hollejos y raspones liofilizadas, homogeneizadas y pesadas, y muestras tras adición de disolventes y agitación.

3.4. Contenido fenólico total (TPC).

El análisis del contenido total de compuestos fenólicos se llevó a cabo a través del ensayo de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965), aunque con ciertos cambios (Jara-Palacios et al., 2014). Para cada extracto, se partió de una alícuota de 0,25 mL, a las que se añadieron 1,25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 3,75 mL de disolución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 20 %. La mezcla fue diluida y homogeneizada con agua destilada hasta un volumen final de 25 mL y se dejó reposar durante 120 minutos, antes de proceder a la medida de la absorbancia. La absorbancia se midió a 765 nm en el espectrofotómetro. Cada muestra se analizó por triplicado. La recta de calibrado se elaboró con un estándar de ácido gálico y el resultado del TPC se expresó en mg de equivalentes de ácido gálico por 100 gramos de muestra (mg GAE/100 g muestra).

3.5. Determinación de compuestos fenólicos individuales.

El análisis se llevó a cabo mediante UHPLC (*Ultra-High Performance Liquid Chromatography*) en fase reversa, en un cromatógrafo configurado para medir señales entre 200 y 770 nm. Como disolvente, se usaron ácido fórmico al 0,01 % en agua (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). Las condiciones del proceso se establecieron conforme al protocolo propuesto por Jara-Palacios (Jara-Palacios et al., 2018): 0–5 min, 5 % lineal B; 5–20 min, 50 % lineal B; 20–25 min, 100 % lineal A. El flujo de disolvente se estableció a una tasa 0.8 mL/min y la temperatura de la columna a 25 °C. Alícuotas de 2 mL de los extractos fenólicos fueron concentradas hasta desecación, resuspendidas en 1 mL de disolvente A y filtradas a través de una membrana con poros de 0.45 µm de diámetro. El volumen inyectado en el cromatógrafo fue de 1 µL.

Previamente al análisis de las muestras, se elaboraron las curvas de calibración con estándares y se establecieron los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ). Otros compuestos fueron identificados previamente por espectrometría de masas y/o datos bibliográficos de tiempo de retención y señales en el espectro UV-visible: ácido gálico, catequina, epicatequina, procianidinas B1 y B2, 3-*O*-glucósidos de quercetina, kaempferol e isoramnetina, 3-*O*-rutinósido de quercetina, 3-*O*-galactósido de kaempferol y 3-*O*-galatos de procianidina B2, en forma de trímero y tetrámero.

La identificación de los compuestos fenólicos se realizó mediante los tiempos de retención de los picos del cromatograma y la cuantificación mediante el cálculo del área bajo la curva de los picos resueltos a 280 nm para flavanoles y ácidos fenólicos y a 370 nm para flavonoles. Cada muestra se analizó por triplicado y los resultados se expresan como cantidad del compuesto fenólico en mg /100 g muestra.

3.6. Evaluación de la actividad antioxidante.

La actividad antioxidante *in vitro* de los extractos fue determinada mediante el ensayo DPPH, en el que se compara la capacidad de estos para neutralizar el radical libre DPPH frente al estándar Trolox, siguiendo los métodos establecidos (Brand-Williams et al., 1995; Soler-Rivas et al., 2000), aunque con algunas modificaciones (Jara-Palacios et al., 2018). Primero, los extractos iniciales fueron descongelados, homogeneizados y diluidos a una concentración adecuada en comparación con el estándar Trolox. El reactivo DPPH se encuentra en una disolución de metanol a una concentración 90 µM. Se añadieron volúmenes de 300 µL, sobre una alícuota de 30 µL de cada extracto, con una cantidad análoga del estándar Trolox y una disolución hidrometanólica al 80 %, que haría las veces de blanco. Las mezclas se diluyeron con 570 µL de metanol y se dejó que transcurra la reacción durante 30 minutos para, una vez pasado el tiempo,

medir la absorbancia a 515 nm. Cada muestra se analizó por cuadruplicado. El resultado se obtiene en equivalentes de Trolox (TE) por gramo de extracto y se recalcula para representarlo como mmol TE/100 g muestra.

3.7. Evaluación de la actividad anticolinesterasa.

Se determinó la capacidad de los extractos para inhibir la enzima AChE (acetilcolinesterasa) mediante un ensayo *in vitro* basado en el método propuesto por Ellman (Ellman et al., 1961), con ciertas modificaciones más actuales (Chattipakorn et al., 2007; Costa et al., 2011). Es un método colorimétrico que consta de dos reacciones. En primer lugar, la reacción enzimática, en la que el sustrato es hidrolizado. Dicho sustrato es el yoduro de acetiltiocolina (ATCI). A continuación, el producto (tiocolina) reacciona con el reactivo de Ellman, el 5,5'-ditiobis-[ácido 2-nitrobenzoico], o DTNB, formando ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, un compuesto de color amarillo con máximo de absorbancia a 405-420 nm.

La medida colorimétrica se llevó a cabo en un espectrofotómetro. Cada muestra se analizó por triplicado. En los pocillos se elaboró la siguiente mezcla: 3 mM DTNB, 15 mM ATCI, 100 mM de tampón fosfato (pH=8) y, por último, los extractos fenólicos diluidos a una concentración de 2.5 mg/mL, que en el pocillo serían 250 µg/mL. Además, la reacción se valoró con un inhibidor estándar, galantamina, y en ausencia de inhibidores, rellenando con una disolución buffer a modo de blanco y para calcular el porcentaje de inhibición de los extractos fenólicos. A continuación, para disparar la reacción, se añadió el extracto enzimático de AChE. La absorbancia fue medida a 405 nm a tiempo cero y tras 5 minutos de reacción. La actividad anticolinesterasa se calculó como porcentaje de la velocidad enzimática sin inhibición y se expresó como porcentaje de inhibición.

3.8. Análisis estadístico.

Todos los cálculos estadísticos se realizaron por medio del software Statistica v8.0, presentando los resultados como la media \pm SD (desviación estándar). Se ha aplicado el Análisis Múltiple de la Varianza para establecer la existencia o no de diferencias significativas entre grupos (S0, S1 y S2), mediante el análisis de las medias de cada uno de los grupos. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante el test de rangos múltiples de Tukey ($p < 0,05$).

4. Resultados y discusión.

4.1. Contenido fenólico total (TPC).

El contenido fenólico total de cada extracto se muestra en la Tabla 1, según el subproducto de vinificación y el disolvente. Se hallaron diferencias significativas ($p < 0,05$) para todos los subproductos en función de los diferentes disolventes. Con los tres disolventes, los extractos de la semilla mostraron la mayor cantidad de compuestos fenólicos, seguido de los extractos de raspón y, en tercer lugar, de hollejo.

Tabla 1. *Contenido fenólico total en los extractos de subproductos de vinificación para tres disolventes diferentes (agua, etanol y agua/etanol al 50 %). Resultados obtenidos mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu y expresados en mg GAE/100 g muestra. Cada valor representa la media \pm SD ($n = 3$). Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los distintos extractos de cada subproducto se muestran con diferentes letras junto al resultado.*

	Agua	Etanol	Agua/Etanol
Semilla	1382,99 \pm 52,55 a	5473,78 \pm 670,01 b	9829,86 \pm 715,42 c
Hollejo	584,20 \pm 19,89 a	198,44 \pm 7,60 b	2797,67 \pm 161,67 c
Raspón	831,71 \pm 23,39 a	402,14 \pm 1,32 b	3745,77 \pm 172,86 c

Para los tres subproductos, la mezcla de agua y etanol al 50 % mostró los mejores resultados, con una cantidad para semillas, raspón y hollejo de 9829,86, 3745,77 y 2797,67 mg GAE/100 g, respectivamente. Los extractos de agua y etanol no siguieron la misma tendencia. El hollejo y el raspón mostraron un mayor TPC en el extracto de agua que en el de etanol (584,20 frente a 198,44 mg GAE/100 g para el hollejo y 831,71 frente a 402,14 mg GAE/100 g para el raspón), mientras que el extracto etanólico de la semilla mostró mayor cantidad de fenoles totales que el extracto acuoso (5473,78 y 1382,99 mg GAE/100 g, respectivamente).

4.2. Determinación de compuestos fenólicos individuales.

Los compuestos fenólicos presentes en mayor cantidad en los subproductos de vinificación pertenecen, principalmente, a tres grupos: ácidos fenólicos, flavanoles y flavonoles. En este trabajo, aunque existen muchos más compuestos presentes, se seleccionaron los 8 más representativos: los ácidos fenólicos gálico y protocatéquico; los flavanoles catequina, epicatequina y procianidina B1; y los flavonoles quercetina-3-*O*-rutinosido, quercetina-3-*O*-glucósido y kaempferol-3-*O*-glucósido. Estos compuestos fueron cuantificados en todos los extractos para valorar las diferencias existentes entre los distintos subproductos y la influencia del disolvente en el perfil fenólico obtenido. Los resultados se muestran por separado para la semilla, el hollejo y el raspón en las Tablas 2, 3 y 4, respectivamente.

La mezcla de agua y etanol al 50 % resultó ser el disolvente más efectivo para casi todos los compuestos en los tres subproductos, con algunas excepciones. Entre ellas destacan el ácido gálico en semillas y el ácido protocatéquico en hollejo, que fueron extraídos en mayor cantidad con agua (41,45 frente a 16,66 mg ácido gálico/100 g en semilla y 5,22 frente a 2,62 mg ácido protocatéquico/100 g en hollejo). Esto se debe a la naturaleza química de dichas moléculas, que con sus grupos hidroxilo y ácido carboxílico, presentan una elevada hidrofilia y solubilidad en agua. También fueron ligeramente superiores, respecto a la mezcla de agua y etanol, las extracciones de ácido protocatéquico con etanol en el hollejo y de ácido gálico con agua en el raspón, pero sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Tabla 2. *Compuestos fenólicos cuantificados en extractos de semilla para tres disolventes diferentes (agua, etanol y agua/etanol al 50 %). Resultados expresados en mg de compuesto/100 g de muestra. Cada valor representa la media \pm SD ($n = 3$). Q: quercetina; K: kaempferol. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre cada compuesto en los distintos extractos se muestran con diferentes letras junto al resultado.*

	Agua	Etanol	Agua/Etanol
Ácidos fenólicos			
Ácido gálico	41,45 \pm 0,27 a	7,42 \pm 0,39 b	16,66 \pm 0,30 c
Ácido protocatéquico	1,54 \pm 0,04 a	2,61 \pm 0,00 b	3,66 \pm 0,07 c
Flavanoles			
Catequina	26,73 \pm 2,33 a,b	22,06 \pm 2,04 a	33,04 \pm 6,25 b
Epicatequina	23,75 \pm 2,07 a	27,47 \pm 0,17 b	40,02 \pm 2,04 c
Procianidina B1	18,09 \pm 1,84 a	22,53 \pm 3,24 a,b	29,36 \pm 6,32 b
Flavonoles			
Q-3-O-rutinósido	0,30 \pm 0,06 a	0,54 \pm 0,18 b	0,95 \pm 0,03 c
Q-3-O-glucósido	1,18 \pm 0,18 a	1,19 \pm 0,36 a	3,76 \pm 0,07 b
K-3-O-glucósido	0,18 \pm 0,00 a	0,20 \pm 0,05 a	0,49 \pm 0,01 b

La semilla destacó por la elevada concentración de ácido gálico y de flavanoles, superior en todos los extractos a sus contrapartes del hollejo y el raspón (Tabla 2). La cantidad de flavanoles resultó muy alta con los tres disolventes. La mezcla de agua y etanol obtuvo los mejores resultados para los tres compuestos, seguida del etanol y por último el agua, salvo en el caso de la catequina, que se extrajo en mayor cantidad con agua que con etanol (33,04, 26,73 y 22,06 mg/100 g, respectivamente). El compuesto con mayor concentración fue la epicatequina (40,02, 27,47 y 23,75 mg/100 g para agua/etanol, etanol y agua). La procianidina B1 fue el compuesto menos abundante, relativamente (29,36, 22,53 y 18,09 mg/100 g). Respecto a los ácidos fenólicos, la cantidad de ácido gálico obtenida en los extractos de semilla fue considerablemente superior a la de ácido protocatéquico. Los flavonoles se detectaron en cantidades muy bajas en comparación con los otros subproductos, siendo el compuesto más abundante la quercetina-3-O-glucósido (3,76 mg/100 g con agua/etanol). Después de la mezcla de agua y etanol, el etanol

puro parece que obtuvo mejores resultados que el agua, pero sin diferencias significativas, con la única excepción de la quercetina-3-*O*-rutinosido.

Tabla 3. Compuestos fenólicos cuantificados en extractos de hollejo para tres disolventes diferentes (agua, etanol y agua/etanol al 50 %). Resultados expresados en mg de compuesto/100 g de muestra. Cada valor representa la media \pm SD ($n = 3$). Q: quercetina; K: kaempferol; NQ: no cuantificado. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre cada compuesto en los distintos extractos se muestran con diferentes letras junto al resultado.

	Agua	Etanol	Agua/Etanol
Ácidos fenólicos			
Ácido gálico	1,65 \pm 0,28 a	3,88 \pm 0,27 b	4,18 \pm 0,40 b
Ácido protocatéquico	5,22 \pm 0,91 a	2,65 \pm 0,33 b	2,62 \pm 0,30 b
Flavanoles			
Catequina	NQ	3,31 \pm 4,67 a	6,81 \pm 0,29 a
Epicatequina	NQ	NQ	6,22 \pm 0,97
Procianidina B1	NQ	2,96 \pm 0,00 a	9,53 \pm 0,06 b
Flavonoles			
Q-3- <i>O</i> -rutinosido	0,23 \pm 0,03 a	5,11 \pm 0,21 b	6,28 \pm 1,39 b
Q-3- <i>O</i> -glucósido	0,53 \pm 0,14 a	28,97 \pm 5,46 b	48,85 \pm 6,54 c
K-3- <i>O</i> -glucósido	4,77 \pm 0,00 a	6,90 \pm 1,10 b	7,38 \pm 0,03 b

El hollejo se mostró como el subproducto con mayor cantidad de flavonoles (Tabla 3). El disolvente que extrajo mejor dichos compuestos fue la mezcla de agua y etanol, seguida del etanol, aunque no se hallaron diferencias significativas entre estos extractos en el caso de la quercetina-3-*O*-rutinosido (6,28 y 5,11 mg/100 g) y del kaempferol-3-*O*-glucósido (7,38 y 6,90 mg/100 g). El compuesto más abundante, con diferencia, fue la quercetina-3-*O*-glucósido (48,85 y 28,97 mg/100 g) Los flavonoles tienen una polaridad intermedia, lo que explicaría su mayor afinidad por disolventes orgánicos que por el agua pura. La extracción de derivados de quercetina en agua fue muy baja (no mucho más de 0,5 mg/100 g), pero la del glucósido de kaempferol (4,77 mg/100 g) se acerca un poco más a los otros disolventes.

La cantidad de flavanoles en el hollejo resultó muy inferior a la de los demás subproductos. El compuesto con mayor concentración fue la procianidina B1 (9,53 mg/100 g con agua/etanol). La catequina y la epicatequina se presentaron en cantidades similares (6,82 y 6,22 mg/100 g, respectivamente). La extracción con etanol fue inferior en todos los casos y la epicatequina ni siquiera alcanzó el límite de cuantificación (LOQ). De igual manera, en el extracto con agua no se pudo cuantificar ninguno de los tres compuestos. Y en lo correspondiente a los ácidos fenólicos, fue en el hollejo donde se obtuvo la mayor cantidad de ácido protocatéquico, en su extracto acuoso. El ácido gálico se encuentra en menor cantidad que en la semilla o el raspón, y

a diferencia de estos subproductos, el extracto acuoso fue el que presentó la menor concentración de este compuesto (1,65 mg/100 g frente a 4,18 mg/100 g en agua/etanol).

Tabla 4. Compuestos fenólicos cuantificados en extractos de raspón para tres disolventes diferentes (agua, etanol y agua/etanol al 50 %). Resultados expresados en mg compuesto/100 g de muestra. Cada valor representa la media \pm SD ($n = 3$). Q: quercetina; K: kaempferol; NQ: no cuantificado. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre cada compuesto en los distintos extractos se muestran con diferentes letras junto al resultado.

	Agua	Etanol	Agua/Etanol
Ácidos fenólicos			
Ácido gálico	14,98 \pm 5,10 a	3,70 \pm 0,02 b	12,36 \pm 1,47 a
Ácido protocatéquico	2,64 \pm 0,26 a	2,15 \pm 0,06 a	5,22 \pm 0,67 b
Flavanoles			
Catequina	6,90 \pm 0,19 a	NQ	23,42 \pm 1,01 b
Epicatequina	6,76 \pm 0,00 a	NQ	17,09 \pm 0,13 b
Procianidina B1	10,38 \pm 5,79 a	NQ	28,33 \pm 2,90 b
Flavonoles			
Q-3-O-rutinósido	0,59 \pm 0,13 a	0,30 \pm 0,01 a	6,62 \pm 0,67 b
Q-3-O-glucósido	5,64 \pm 1,97 a	0,77 \pm 0,01 a	45,05 \pm 7,73 b
K-3-O-glucósido	0,56 \pm 0,03 a	NQ	3,73 \pm 0,47 b

El raspón no se destacó como la mayor fuente de ningún grupo fenólico en concreto, pero presentó unas cantidades elevadas de todos ellos (Tabla 4). El ácido protocatéquico alcanzó la mayor concentración en el extracto hidroalcohólico, una cantidad exactamente igual a la del extracto en agua de hollejo (5,22 mg/100 g). El raspón también presentó una cantidad importante de ácido gálico (hasta 14,98 mg/100 g en agua) y de los distintos flavanoles en los extractos de la mezcla agua/etanol. De este último grupo, la mayor concentración corresponde a la procianidina B1 (28,33 mg/100 g), con la catequina y epicatequina en cantidades algo inferiores (23,42 y 17,09 mg/100 g). La extracción de flavanoles en agua fue mucho menor (hasta 10,38 mg de procianidina B1/100 g) y en etanol no llegó a alcanzar el LOQ.

Por último, en el grupo de los flavonoles destacaron la quercetina-3-O-glucósido (45,05 mg/100 g) y rutinósido (6,62 mg/100 g), con cantidades similares a las del hollejo en el extracto de agua/etanol. A diferencia del hollejo, estos compuestos se extrajeron en cantidades superiores en agua (5,64 y 0,59 mg/100 g) que en etanol puro (0,77 y 0,30 mg/100 g, respectivamente), aunque no presentan unas diferencias significativas, especialmente en el caso del rutinósido. El kaempferol-3-O-glucósido fue el que se encontró en menor concentración (3,73 y 0,56 mg/100g en la mezcla hidroalcohólica y en agua; en etanol no superó el LOQ).

Las semillas, el hollejo y el raspón poseen un perfil fenólico muy variado, con diferentes cantidades de distintos compuestos fenólicos, cada uno con polaridades y solubilidad propias.

Esto hace que no exista ningún disolvente que maximice la extracción de todos los compuestos fenólicos en los distintos elementos del orujo. El agua y el etanol en solitario presentan ciertas limitaciones. El agua es un disolvente con una polaridad muy elevada, lo que hace que ciertos compuestos, como los flavonoles, no se disuelvan bien, y que se extraiga mayor cantidad de otros componentes como azúcares, ácidos orgánicos y proteínas solubles, que pueden interferir en el análisis de los compuestos fenólicos. El etanol, en cambio, tiene una polaridad más reducida y dificulta la disolución de compuestos más hidrófilos, como los ácidos fenólicos. El etanol puro también presenta el problema de deshidratar la muestra en exceso, dificultando el paso de los compuestos del interior de la célula al disolvente. Estos factores explicarían el mayor rendimiento, en general, de la combinación de agua y etanol. La mezcla al 50 %, tal como se ha usado en este trabajo, es la que logra los mejores resultados, como demostraron diversos estudios (Bucić-Kojić et al., 2009; Sant'Anna et al., 2012).

Además, cada disolvente interacciona de manera diferente con los distintos materiales vegetales, ya que cada uno tiene una composición química y unas características estructurales propias. El hollejo presentó un comportamiento diferente en la extracción con agua, tal como muestran los resultados de ácido gálico y de flavanoles, al compararlos con los demás disolventes y subproductos. El hollejo tiene la función de proteger a la uva de factores externos y de la deshidratación, y para ello, posee varias capas de células con una pared celular muy densa, con polisacáridos, lignina y proantocianidinas de elevado grado de polimerización, y una cutícula externa impermeable (Pinelo et al., 2006; Spigno et al., 2017). Por esta razón, su propia estructura podría dificultar la difusión de los compuestos fenólicos desde el interior de las células al disolvente, al quedar atrapados en la matriz sólida y en los huecos hidrófobos.

De manera general, el perfil fenólico de los subproductos se mostró en concordancia con estudios anteriores de la variedad de uva Zalema (Jara-Palacios et al., 2013; Jara-Palacios et al., 2014). Esta variedad destaca, respecto a otras variedades de uva blanca, por el elevado contenido de flavonoles, debido especialmente a quercetina-3-*O*-glucósido y, como todas las uvas blancas, por los flavan-3-oles y el ácido gálico (Jara-Palacios et al., 2014). La purificación de estos compuestos a partir de los subproductos de vinificación podría ser interesante para las industrias farmacéutica y cosmética.

Se les atribuyen numerosas actividades biológicas al ácido gálico y sus derivados, como antibacterianos, antivirales, antiinflamatorios, antitumorales y antihiperlipémicos, (Kaur et al., 2009; Kroes et al., 2007; Liu et al., 2020; Subramanian et al., 2015). La quercetina y sus derivados interactúan con diversos procesos fisiológicos gracias a su afinidad por determinados

receptores, su capacidad de inhibir ciertas enzimas y de bloquear rutas de señalización celular. Destacan sus efectos antioxidantes (por inhibición de enzimas monooxigenasas asociadas a citocromo p-450, ciclooxigenasa, lipooxigenasa y xantina oxidasa), antiinflamatorios y protectores gástrico, renal, osteoarticular y cardiovascular (por efectos hemostáticos, endoteliales en la aterosclerosis y de inhibición de la apoptosis durante procesos isquémicos en el miocardio), además de sus diferentes mecanismos antitumorales (antiproliferativo, proapoptótico, inducción de mecanismos citotóxicos como el TNF- α , etc.) (Dihal et al., 2006; Shebeko et al., 2018; Thangasamy et al., 2009). Asimismo, los flavanoles como la catequina, epicatequina y procianidinas han demostrado funciones similares como antimicrobianos, antiinflamatorios, anticancerosos, reductores de la colesterolemia y cardioprotectores (Fraga y Oteiza, 2011; Gadkari y Balaraman, 2015; Prakash et al., 2019).

4.3. Evaluación de la actividad antioxidante.

La actividad antioxidante de los extractos fenólicos, determinada mediante el ensayo DPPH, se muestra en la tabla 5. Todos los extractos de los diferentes subproductos y disolventes mostraron cierta capacidad para neutralizar el radical DPPH, en mayor o menor medida.

Tabla 5. Actividad antioxidante de los extractos de subproductos de vinificación para tres disolventes diferentes (agua, etanol y agua/etanol al 50 %) Resultados obtenidos mediante el ensayo DPPH y expresados como mmol TE/100 g muestra. Cada valor representa la media \pm SD ($n = 4$). Para cada subproducto, las diferencias estadísticamente significativas entre los distintos extractos se muestran con diferentes letras junto al resultado.

	Agua		Etanol		Agua/Etanol	
Semilla	7,95 \pm 5,30	a	38,01 \pm 2,59	b	50,44 \pm 4,32	c
Hollejo	3,08 \pm 0,08	a	0,77 \pm 0,13	a	34,96 \pm 2,47	b
Raspón	4,02 \pm 0,10	a	1,65 \pm 0,10	b	28,10 \pm 1,49	c

Los extractos de semilla mostraron la mayor actividad antioxidante respecto a los otros subproductos, siendo la mezcla agua/etanol al 50 % el disolvente con el que se obtuvo el mejor resultado, seguido del etanol y, por último, del agua (50,44, 38,01 y 7,95 mmol TE/100 g, respectivamente). Este orden no se mantuvo para el hollejo y el raspón. La mezcla agua/etanol también fue el disolvente que obtuvo mejores resultados (34,96 mmol TE/100 g para hollejo y 28,10 para raspón), pero los extractos con agua mostraron mayor actividad antioxidante que los extractos con etanol, aunque obtuvieron valores muy reducidos en cualquier caso (3,08 y 0,77 mmol TE/100 g para el hollejo y 4,02 y 1,65 mmol TE/100 g para el raspón, respectivamente, en agua y en etanol puros). Los resultados de la actividad antioxidante de los diferentes extractos

de cada subproducto mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en todos los casos, salvo los extractos de hollejo en agua y etanol.

Los resultados obtenidos de la capacidad antioxidante de los extractos siguieron la misma tendencia que el TPC determinado previamente. Se elaboró una recta de regresión lineal entre ambas variables para los tres extractos de cada subproducto y se calcularon los coeficientes de correlación para la semilla ($r = 0,968$), el hollejo ($r = 0,997$) y el raspón ($r = 0,999$). De igual manera, se calculó teniendo en cuenta los 9 extractos y se obtuvo una recta menos exacta en la correlación ($r = 0,926$), teniendo en cuenta la anomalía de que el hollejo, con menor TPC que el raspón en el extracto de agua/etanol, presentó mayor actividad antioxidante. Esto podría deberse a la mayor concentración de flavonoles, que poseen una elevada capacidad para neutralizar radicales libres.

Estos resultados y la correlación establecida concuerdan con estudios similares en los que se determina la capacidad antioxidante mediante el ensayo DPPH (Anastasiadi et al., 2010; Peixoto et al., 2018). No obstante, esta linealidad no se aprecia al determinarla por otros métodos, como el ensayo ORAC, debido a que basa su determinación en mecanismos diferentes (Jara-Palacios et al., 2020). La actividad antioxidante no se relaciona de manera exactamente lineal con el TPC por la diferente composición fenólica de los extractos, ya que cada compuesto puede presentar una capacidad diferente para neutralizar los radicales libres. De hecho, es probable que la correlación real sea incluso menor, ya que una de las limitaciones de la determinación del TPC es la interacción de otros componentes como azúcares y aminoácidos aromáticos con el reactivo de Folin-Ciocalteu, ofreciendo unos resultados ligeramente superiores a los reales (Bucić-Kojić et al., 2009). Para mejorar esta asociación, se deberían cuantificar todos los compuestos fenólicos presentes en la muestra y establecer la correlación por separado.

4.4. Evaluación de la actividad anticolinesterasa.

La determinación de la actividad anticolinesterasa se realizó mediante un ensayo colorimétrico *in vitro* con todos los extractos estandarizados a una concentración de 2,5 mg/mL, que en la cubeta del espectrofotómetro corresponde a 250 μ g/mL. Los resultados se muestran gráficamente en la Fig. 5, expresados como el porcentaje de inhibición.

Cada subproducto mostró un comportamiento diferente en sus tres extractos. En la semilla, que fue el subproducto con mayor actividad anticolinesterasa, el extracto con mayor actividad fue el de etanol, seguido del de agua/etanol y el de agua (53,9, 48,9 y 39,5 %, respectivamente). En segundo lugar, se situó el raspón, cuyos extractos con mayor actividad, en orden descendente, fueron los de agua/etanol, etanol y agua (45,2, 27,7 y 17,3%). Los porcentajes de

inhibición del hollejo fueron los más reducidos, siendo el mayor el del extracto de agua/etanol, seguido del de agua y el de etanol (39,9, 25,1 y 19,6%). En la literatura se pueden encontrar diversos estudios que atribuyen esta actividad a determinados compuestos fenólicos y productos vegetales, pero existe poca información sobre la uva y los subproductos de vinificación, especialmente de variedades de uva blanca. Los resultados mostrados en este trabajo concuerdan con otras investigaciones en el tema, e incluso muestran una actividad mayor que subproductos de otras variedades tintas (Jara-Palacios et al., 2020; Tkacz et al., 2019).

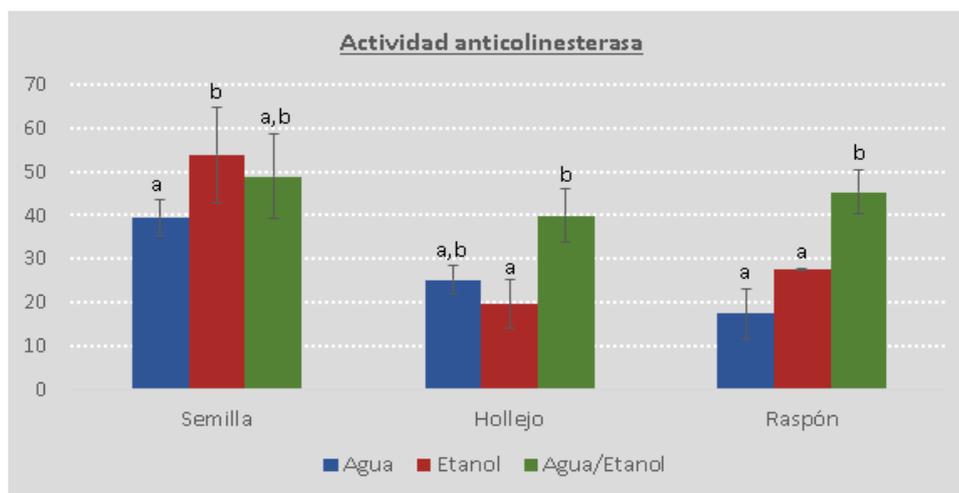


Figura 5. Actividad anticolinesterasa de los extractos de subproductos de vinificación para tres disolventes diferentes (agua, etanol y agua/etanol al 50%). Resultados obtenidos mediante ensayo *in vitro* y expresados como porcentaje de inhibición. Cada valor representa la media \pm SD ($n=3$). Para cada subproducto, las diferencias estadísticamente significativas entre los distintos extractos se muestran con diferentes letras junto al resultado.

La estandarización de la concentración de los extractos elimina los efectos del TPC en la correlación de la actividad biológica. Se entiende, por tanto, que las diferencias en los resultados se deben exclusivamente al perfil fenólico de cada extracto y a las diferentes capacidades de cada compuesto para inhibir la enzima AChE. Comparando con los resultados de HPLC de los diferentes extractos, no parece indicar que ningún compuesto concreto sea responsable de dichas diferencias. Se necesitarán estudios más completos que involucren a más compuestos y que determinen la actividad anticolinesterasa de cada uno de ellos por separado y a diferentes concentraciones. No obstante, estos resultados demuestran que los extractos ricos en diversos grupos y compuestos fenólicos presentan actividad anticolinesterasa.

La galantamina, un alcaloide natural inhibidor de la AChE, fue usado como control positivo del ensayo, obteniendo un porcentaje de inhibición del 55,9%, aunque en otros estudios dicho porcentaje alcanza valores cercanos al 70% (Costa et al., 2013). Este compuesto ha sido probado

para el tratamiento del Alzheimer. Aunque mostró efectos positivos, su uso no se ha extendido demasiado porque no solucionaba los efectos adversos típicos de los anticolinesterásicos clásicos (Loy y Schneider, 2006). La elevada actividad anticolinesterasa de los compuestos fenólicos presentes en los subproductos de vinificación podría aprovecharse para investigaciones futuras en el ámbito clínico.

5. Conclusiones.

En este trabajo se han evaluado los componentes del orujo (semillas, hollejos y raspones), principal subproducto de la vinificación, de la variedad de uva Zalema como fuente de compuestos fenólicos con actividad biológica. La extracción de dichos compuestos se ha llevado a cabo mediante un método sencillo, una extracción sólido-líquido convencional, y de bajo impacto ecológico, con disolventes inocuos (agua, etanol y mezcla de agua y etanol al 50 %) a temperatura ambiente. A partir de los resultados, se formulan las siguientes conclusiones:

Primera. La mezcla de agua y etanol proporciona el mejor rendimiento de extracción para los tres tipos de muestras, tanto para el contenido fenólico total como para la mayoría de los compuestos fenólicos individuales.

Segunda. La semilla destaca como la mejor fuente de compuestos fenólicos a nivel general y, en particular, de flavanoles (catequina, epicatequina y procianidinas) y de ácido gálico. Le sigue el raspón en contenido total, con cantidades moderadas de todos los grupos fenólicos determinados. El hollejo presenta el contenido fenólico más reducido, pero destaca por poseer la mayor cantidad de flavonoles (quercetina-3-O-glucósido, principalmente).

Tercera. La actividad antioxidante de los extractos, determinada por su capacidad para neutralizar al radical libre DPPH, sigue una correlación lineal con el contenido fenólico total, con algunas desviaciones debidas a la diferente composición de los extractos. La mayor actividad antioxidante se encontró en los extractos en agua/etanol y en etanol de la semilla, seguido de los extractos en agua/etanol de hollejo y raspón.

Cuarta. Los extractos fenólicos inhiben a la enzima acetilcolinesterasa. Se necesitan más estudios para determinar la capacidad inhibitoria de cada compuesto y a qué concentraciones son activos. De los extractos evaluados, los que inhiben en mayor medida esta enzima son, en orden descendente, los extractos en etanol de semilla y en agua/etanol de semilla, raspón y hollejo.

Bibliografía.

- Afanas'ev, I. B., Dcrozko, A. I., Brodskii, A. v., Kostyuk, V. A., & Potapovitch, A. I. (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, 38(11), 1763–1769. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90410-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90410-3)
- Álvarez, A., Poejo, J., Matias, A. A., Duarte, C. M. M., Cocero, M. J., & Mato, R. B. (2017). Microwave pretreatment to improve extraction efficiency and polyphenol extract richness from grape pomace. Effect on antioxidant bioactivity. *Food and Bioproducts Processing*, 106, 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.09.007>
- Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Skaltsounis, A. L., & Haroutounian, S. A. (2010). Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. *Food Research International*, 43(3), 805–813. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.11.017>
- Athanassiou, P., Athanassiou, L., & Kostoglou-Athanassiou, I. (2020). Nutritional Pearls: Diet and Rheumatoid Arthritis. *Mediterranean Journal of Rheumatology*, 31(3), 319–324. <https://doi.org/10.31138/mjr.31.3.319>
- Ávalos, A., & Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal, 2(3), 119–145.
- Badarinath, A. v, Rao, K. M., Madhu, C., Chetty, S., Ramkanth, S., Rajan, T. V. S., & Gnanaprakash, K. (2010). A Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations and Considerations. *International Journal of PharmTech Research*, 2(2), 1276–1285.
- Bail, S., Stuebiger, G., Krist, S., Unterweger, H., & Buchbauer, G. (2008). Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 108(3), 1122–1132. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.063>
- Bao, Y., Reddivari, L., & Huang, J. Y. (2020). Development of cold plasma pretreatment for improving phenolics extractability from tomato pomace. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 65, 102445. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102445>
- Barba, F. J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, A. S., & Orlien, V. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 49, 96–109. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.006>
- Barber, N., Taylor, C., & Strick, S. (2009). Wine consumers' environmental knowledge and attitudes: Influence on willingness to purchase. *International Journal of Wine Research*, 1(1), 72. <https://doi.org/10.2147/IJWR.S4649>
- Bhat, A. H., Dar, K. B., Anees, S., Zargar, M. A., Masood, A., Sofi, M. A., & Ganie, S. A. (2015). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 74, pp. 101–110). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.07.025>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. In *LWT - Food Science and Technology* (Vol. 28, Issue 1, pp. 25–30). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Jakobek, L., & Šeruga, M. (2009). Influence of solvent and temperature on extraction of phenolic compounds from grape seed, antioxidant activity and colour of extract. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(12), 2394–2401. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01876.x>
- Bustamante, M. A., Moral, R., Paredes, C., Pérez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J., & Pérez-Murcia, M. D. (2008). Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Management*, 28(2), 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.01.013>
- Bustamante, M. A., Said-Pullicino, D., Agulló, E., Andreu, J., Paredes, C., & Moral, R. (2011). Application of winery and distillery waste composts to a Jumilla (SE Spain) vineyard: Effects on the characteristics of a calcareous sandy-loam soil. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 140(1–2), 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2010.11.014>

- Cáceres, C. X., Cáceres, R. E., Hein, D., Molina, M. G., & Pia, J. M. (2012). Biogas production from grape pomace: Thermodynamic model of the process and dynamic model of the power generation system. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(13), 10111–10117. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.178>
- Cassidy, A., & Kay, C. (2012). Phytochemicals: Classification and Occurrence. In *Encyclopedia of Human Nutrition* (Vols. 4–4, pp. 39–46). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00226-9>
- Castellarin, S. D., Matthews, M. A., di Gaspero, G., & Gambetta, G. A. (2007). Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta*, 227(1), 101–112. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0598-8>
- Celma, A. R., Rojas, S., & López-Rodríguez, F. (2007). Waste-to-energy possibilities for industrial olive and grape by-products in Extremadura. *Biomass and Bioenergy*, 31(7), 522–534. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2006.08.007>
- Chattipakorn, S., Pongpanparadorn, A., Pratchayasakul, W., Pongchaidacha, A., Ingkaninan, K., & Chattipakorn, N. (2007). Tabernaemontana divaricata extract inhibits neuronal acetylcholinesterase activity in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 110(1), 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.007>
- Cho, S. Y., Kim, H. W., Lee, M. K., Kim, H. J., Kim, J. B., Choe, J. S., Lee, Y. M., & Jang, H. H. (2020). Antioxidant and anti-inflammatory activities in relation to the flavonoids composition of pepper (*Capsicum annum* L.). *Antioxidants*, 9(10), 1–11. <https://doi.org/10.3390/antiox9100986>
- Christ, K. L., & Burritt, R. L. (2013). Critical environmental concerns in wine production: An integrative review. *Journal of Cleaner Production*, 53, 232–242. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.04.007>
- Comisión Europea. (2019). *Report on the implementation of the Circular Economy Action Plan*. https://ec.europa.eu/commission/publications/report-implementation-circular-economy-action-plan-1_es
- Corona, G., Deiana, M., Incani, A., Vauzour, D., Assunta Dessi, M., & Spencer, J. P. E. (2007). Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362(3), 606–611. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.049>
- Costa, P., Gonçalves, S., Andrade, P. B., Valentão, P., & Romano, A. (2011). Inhibitory effect of *Lavandula viridis* on Fe²⁺-induced lipid peroxidation, antioxidant and anti-cholinesterase properties. *Food Chemistry*, 126(4), 1779–1786. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.085>
- Costa, P., Gonçalves, S., Valentão, P., Andrade, P. B., & Romano, A. (2013). Accumulation of phenolic compounds in in vitro cultures and wild plants of *Lavandula viridis* L'Hér and their antioxidant and anti-cholinesterase potential. *Food and Chemical Toxicology*, 57, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.03.006>
- di Donato, P., Taurisano, V., Tommonaro, G., Pasquale, V., Jiménez, J. M. S., de Pascual-Teresa, S., Poli, A., & Nicolaus, B. (2018). Biological Properties of Polyphenols Extracts from Agro Industry's Wastes. *Waste and Biomass Valorization*, 9(9), 1567–1578. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9939-4>
- di Vita, G., Pappalardo, G., Chinnici, G., la Via, G., & D'Amico, M. (2019). Not everything has been still explored: Further thoughts on additional price for the organic wine. *Journal of Cleaner Production*, 231, 520–528. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.05.268>
- Dihal, A. A., Woutersen, R. A., Ommen, B. van, Rietjens, I. M. C. M., & Stierum, R. H. (2006). Modulatory effects of quercetin on proliferation and differentiation of the human colorectal cell line Caco-2. *Cancer Letters*, 238(2), 248–259. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.07.007>
- Dimou, C., Kopsahelis, N., Papadaki, A., Papanikolaou, S., Kookos, I. K., Mandala, I., & Koutinas, A. A. (2015). Wine lees valorization: Biorefinery development including production of a generic fermentation feedstock employed for poly(3-hydroxybutyrate) synthesis. *Food Research International*, 73, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.02.020>
- Domínguez-Ávila, J. A., Olivas-Aguirre, F. J., de la Rosa, L. A., Wall-Medrano, A., & González-Aguilar, G. A. (2017). Flavonoids and Their Relation to Human Health. In *Fruit and Vegetable Phytochemicals* (Vol. 1, pp. 139–154). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119158042.ch7>

- Downey, M. O., Dokoozlian, N. K., & Krstic, M. P. (2006). Cultural Practice and Environmental Impacts on the Flavonoid Composition of Grapes and Wine: A Review of Recent Research. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 257–268. <https://europepmc.org/article/agr/ind43845878>
- Drosou, C., Kyriakopoulou, K., Bimpilas, A., Tsimogiannis, D., & Krokida, M. (2015). A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Industrial Crops and Products*, 75, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.063>
- el Achkar, J. H., Lendormi, T., Salameh, D., Louka, N., Maroun, R. G., Lanoisellé, J. L., & Hobaika, Z. (2018). Influence of pretreatment conditions on lignocellulosic fractions and methane production from grape pomace. *Bioresource Technology*, 247, 881–889. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.182>
- Eleonora, N., Alina, D., Erzsebet, K., & Valeria, C. (2014). Grape pomace as fertilizer. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 18(2), 141–145. www.journal-hfb.usab-tm.ro
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Erlund, I., Koli, R., Alfthan, G., Marniemi, J., Puukka, P., Mustonen, P., Mattila, P., & Jula, A. (2008). Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87(2), 323–331. <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.2.323>
- Eurostat Comext. (2018). *2018 Comext Wine Trade results*. https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/farming/facts-and-figures/markets/trade/trade-sector/plant-products/wine_es
- Fernandes, S. S., Coelho, M. S., & Salas-Mellado, M. de las M. (2018). Bioactive Compounds as Ingredients of Functional Foods: Polyphenols, Carotenoids, Peptides From Animal and Plant Sources New. In *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications* (pp. 129–142). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00007-4>
- Fontana, A., Antonioli, A., & Bottini, R. (2013). Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(38), 8987–9003. <https://doi.org/10.1021/jf402586f>
- Fontana, A., Antonioli, A., & Bottini, R. (2017). Extraction, Characterization and Utilization of Bioactive Compounds from Wine Industry Waste. In Q. v. Vuong (Ed.), *Utilisation of bioactive compounds from agricultural and food waste* (pp. 213–229). CRC Press / Taylor & Francis Group. <https://www.researchgate.net/publication/317380746>
- Fraga, C. G., & Oteiza, P. I. (2011). Dietary flavonoids: Role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 51, Issue 4, pp. 813–823). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.002>
- Friedman, M. (2014). Antibacterial, antiviral, and antifungal properties of wines and winery byproducts in relation to their flavonoid content. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 62, Issue 26, pp. 6025–6042). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/jf501266s>
- Gadkari, P. V., & Balaraman, M. (2015). Catechins: Sources, extraction and encapsulation: A review. In *Food and Bioprocess Processing* (Vol. 93, pp. 122–138). Institution of Chemical Engineers. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.12.004>
- Garrido, J., & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols - A chemical perspective. In *Food Research International* (Vol. 54, Issue 2, pp. 1844–1858). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.002>
- González-Neves, G., Franco, J., Barreiro, L., Gil, G., Moutounet, M., & Carbonneau, A. (2007). Varietal differentiation of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and wines according to their anthocyanic composition. *European Food Research and Technology*, 225(1), 111–117. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0388-8>
- González-Neves, G., Gil, G., Favre, G., & Ferrer, M. (2011). Potencial polifenólico de la uva: índices propuestos y posibles aplicaciones. *Comunicata Scientiae*, 2(2), 57–69. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3884061>

- Guerra-Rivas, Gallardo, B., Lavín, P. 2, Mantecón A R, & Manso, Y. (2013). El orujo de uva en la alimentación de ganado ovino: composición química, degradación de materia seca, pH Y N-NH₃ ruminal. *AIDA XV Jornadas Sobre Producción Animal.*, 249–251. http://digital.csic.es/bitstream/10261/79117/1/AIDA_2013_Mantecon_249-251_%282013%29.pdf
- Halliwell, B. (2007). Oxidative stress and cancer: Have we moved forward? *Biochemical Journal*, 401(1), 1–11. <https://doi.org/10.1042/BJ20061131>
- Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S. V., & Peralta, R. M. (2012). Phenolic compounds in fruits - an overview. In *International Journal of Food Science and Technology* (Vol. 47, Issue 10, pp. 2023–2044). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x>
- Hassan, Y. I., Kosir, V., Yin, X., Ross, K., & Diarra, M. S. (2019). Grape Pomace as a Promising Antimicrobial Alternative in Feed: A Critical Review. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 67, Issue 35, pp. 9705–9718). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02861>
- Hogervorst, J. C., Miljić, U., & Puškaš, V. (2017). Extraction of Bioactive Compounds from Grape Processing By-Products. In *Handbook of Grape Processing By-Products: Sustainable Solutions* (pp. 105–135). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809870-7.00005-3>
- Ianni, A., Maio, G. di, Pittia, P., Perpetuini, G., Grotta, L., Tofalo, R., Cichelli, A., & Martino, G. (2019). Chemical-nutritional quality and oxidative stability of milk and dairy products obtained from Friesian cows fed with a dietary supplementation of dried grape pomace. *Article in Journal of the Science of Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9584>
- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. In *Food Chemistry* (Vol. 126, Issue 4, pp. 1821–1835). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>
- Jabir, N. R., Khan, F. R., & Tabrez, S. (2018). Cholinesterase targeting by polyphenols: A therapeutic approach for the treatment of alzheimer's disease. In *CNS Neuroscience and Therapeutics* (Vol. 24, Issue 9, pp. 753–762). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/cns.12971>
- Jara-Palacios, M. J., Gonçalves, S., Heredia, F. J., Hernanz, D., & Romano, A. (2020). Extraction of antioxidants from winemaking byproducts: Effect of the solvent on phenolic composition, antioxidant and anti-cholinesterase activities, and electrochemical behaviour. *Antioxidants*, 9(8), 1–15. <https://doi.org/10.3390/antiox9080675>
- Jara-Palacios, M. J., Gonçalves, S., Hernanz, D., Heredia, F. J., & Romano, A. (2018). Effects of in vitro gastrointestinal digestion on phenolic compounds and antioxidant activity of different white winemaking byproducts extracts. *Food Research International*, 109, 433–439. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.060>
- Jara-Palacios, M. J., González-Manzano, S., Escudero-Gilete, M. L., Hernanz, D., Dueñas, M., González-Paramás, A. M., Heredia, F. J., & Santos-Buelga, C. (2013). Study of Zalema grape pomace: Phenolic composition and biological effects in caenorhabditis elegans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(21), 5114–5121. <https://doi.org/10.1021/jf400795s>
- Jara-Palacios, M. J., Hernanz, D., Escudero-Gilete, M. L., & Heredia, F. J. (2014). Antioxidant potential of white grape pomaces: Phenolic composition and antioxidant capacity measured by spectrophotometric and cyclic voltammetry methods. *Food Research International*, 66, 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.009>
- Jara-Palacios, M. J., Hernanz, D., González-Manzano, S., Santos-Buelga, C., Escudero-Gilete, M. L., & Heredia, F. J. (2014). Detailed phenolic composition of white grape by-products by RRLC/MS and measurement of the antioxidant activity. *Talanta*, 125, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.02.065>
- Kaur, M., Velmurugan, B., Rajamanickam, S., Agarwal, R., & Agarwal, C. (2009). Gallic acid, an active constituent of grape seed extract, exhibits anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-tumorigenic effects against prostate carcinoma xenograft growth in nude mice. *Pharmaceutical Research*, 26(9), 2133–2140. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-9926-y>
- Khanbabaee, K., & van Ree, T. (2001). Tannins: Classification and definition. In *Natural Product Reports* (Vol. 18, Issue 6, pp. 641–649). The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/b101061j>

- Koutinas, A. A., Vlysidis, A., Pleissner, D., Kopsahelis, N., Lopez Garcia, I., Kookos, I. K., Papanikolaou, S., Kwan, T. H., & Lin, C. S. K. (2014). Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. In *Chemical Society Reviews* (Vol. 43, Issue 8, pp. 2587–2627). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c3cs60293a>
- Kroes, B. H., Berg, A. J. J. van den, Ufford, H. C. Q. van, Dijk, H. van, & Labadie, R. P. (2007). Anti-Inflammatory Activity of Gallic Acid. *Planta Medica*, 58(06), 499–504. <https://doi.org/10.1055/S-2006-961535>
- Landrault, N., Poucheret, P., Ravel, P., Gasc, F., Cros, G., & Teissedre, P. L. (2001). Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3341–3348. <https://doi.org/10.1021/jf010128f>
- Lavelli, V., Kerr, W. L., García-Lomillo, J., & González-SanJosé, M. L. (2017). Applications of Recovered Bioactive Compounds in Food Products. In *Handbook of Grape Processing By-Products: Sustainable Solutions* (pp. 233–266). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809870-7.00010-7>
- León-González, A. J., Jara-Palacios, M. J., Abbas, M., Heredia, F. J., & Schini-Kerth, V. B. (2017). Role of epigenetic regulation on the induction of apoptosis in Jurkat leukemia cells by white grape pomace rich in phenolic compounds. *Food and Function*, 8(11), 4062–4069. <https://doi.org/10.1039/c7fo00263g>
- Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados, 181 Boletín Oficial del Estado 85650 (2011). <https://www.boe.es/boe/dias/2011/07/29/pdfs/BOE-A-2011-13046.pdf>
- Lingua, M. S., Fabani, M. P., Wunderlin, D. A., & Baroni, M. v. (2016). In vivo antioxidant activity of grape, pomace and wine from three red varieties grown in Argentina: Its relationship to phenolic profile. *Journal of Functional Foods*, 20, 332–345. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.10.034>
- Liu, J., Yong, H., Liu, Y., & Bai, R. (2020). Recent advances in the preparation, structural characteristics, biological properties and applications of gallic acid grafted polysaccharides. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 156, pp. 1539–1555). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.202>
- Loy, C., & Schneider, L. (2006). Galantamine for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd001747.pub3>
- Maleki, S. J., Crespo, J. F., & Cabanillas, B. (2019). Anti-inflammatory effects of flavonoids. In *Food Chemistry* (Vol. 299). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125124>
- Malta, L. G., & Liu, R. H. (2014). Analyses of Total Phenolics, Total Flavonoids, and Total Antioxidant Activities in Foods and Dietary Supplements. In *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems* (pp. 305–314). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00058-9>
- Markakis, P. (1982). Anthocyanins as Food Additives. In *Anthocyanins As Food Colors* (pp. 245–253). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-472550-8.50013-5>
- Maroun, R. G., Rajha, H. N., Vorobiev, E., & Louka, N. (2017). Emerging Technologies for the Recovery of Valuable Compounds From Grape Processing By-Products. In *Handbook of Grape Processing By-Products: Sustainable Solutions* (pp. 155–181). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809870-7.00007-7>
- Mitić, M. N., Obradović, M. v., Grahovac, Z. B., & Pavlović, A. N. (2010). Antioxidant capacities and phenolic levels of different varieties of Serbian white wines. *Molecules*, 15(3), 2016–2027. <https://doi.org/10.3390/molecules15032016>
- Moletta, R. (2005). Winery and distillery wastewater treatment by anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, 51(1), 137–144. <https://doi.org/10.2166/wst.2005.0017>
- Molina-Alcaide, E., Moumen, A., & Martín-García, A. I. (2008). By-products from viticulture and the wine industry: potential as sources of nutrients for ruminants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(4), 597–604. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3123>
- Moons, I., Barbarossa, C., & de Pelsmacker, P. (2018). The Determinants of the Adoption Intention of Eco-friendly Functional Food in Different Market Segments. *Ecological Economics*, 151, 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2018.05.012>

- Moruno, E. G., Sanlorenzo, C., Boccaccino, B., & di Stefano, R. (2005). Treatment with Yeast to Reduce the Concentration of Ochratoxin A in Red Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(1).
- Moss, D. E. (2020). Improving anti-neurodegenerative benefits of acetylcholinesterase inhibitors in alzheimer's disease: Are irreversible inhibitors the future? In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21103438>
- Murkovic, M. (2015). Phenolic Compounds: Occurrence, Classes, and Analysis. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 346–351). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00539-0>
- Na, H. K., & Surh, Y. J. (2008). Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. *Food and Chemical Toxicology*, 46(4), 1271–1278. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.10.006>
- OIV. (2013). *International Organisation of Vine and Wine (OIV). Lista internacional de variedades de vid y sus sinónimos. Edición Español 2013*. <http://www.oiv.int/es/normas-y-documentos-tecnicos/descripcion-de-variedades/lista-internacional-de-las-variedades-de-vid-y-de-sus-sinonimos>
- OIV. (2016). *International Organisation of Vine and Wine (OIV). Código Internacional de Prácticas Enológicas Edición Español, 2016*. <http://www.oiv.int/public/medias/4902/code-2016-es.pdf>
- OIV. (2019). *International Organisation of Vine and Wine (OIV). Balance 2019 de la OIV sobre la situación vitivinícola mundial*. <http://www.oiv.int/es/actualidad-de-la-oiv/balance-2019-de-la-oiv-sobre-la-situacion-vitivinicola-mundial>
- Olszewska, M. A., Gędas, A., & Simões, M. (2020). Antimicrobial polyphenol-rich extracts: Applications and limitations in the food industry. In *Food Research International* (Vol. 134, p. 109214). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109214>
- ONU. (2015). Transformar nuestro mundo: la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible. In *Resoluciones de la Asamblea General de las Naciones Unidas*. http://www.un.org/ga/search/view_doc.asp?symbol=A/70/L.1&Lang=S
- Oraman, Y. (2014). An Analytic Study of Organic Food Industry as Part of Healthy Eating Habit in Turkey: Market Growth, Challenges and Prospects. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, 150, 1030–1039. <https://doi.org/10.1016/j.sbspro.2014.09.115>
- Paredes, F., & Clemente, A. (2005). Polifenoles de aplicación en farmacia. *Offarm*, 24(8), 85–94. <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-polifenoles-aplicacion-farmacia-13078579>
- Patil, B. S., Jayaprakasha, G. K., Chidambara Murthy, K. N., & Vikram, A. (2009). Bioactive compounds: Historical perspectives, opportunities and challenges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8142–8160. <https://doi.org/10.1021/jf9000132>
- Patra, J. K., Das, G., Lee, S., Kang, S. S., & Shin, H. S. (2018). Selected commercial plants: A review of extraction and isolation of bioactive compounds and their pharmacological market value. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 82, pp. 89–109). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.10.001>
- Peixoto, C. M., Dias, M. I., Alves, M. J., Calhelha, R. C., Barros, L., Pinho, S. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. *Food Chemistry*, 253, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.163>
- Pérez-Serradilla, J. A., & Luque de Castro, M. D. (2008). Role of lees in wine production: A review. In *Food Chemistry* (Vol. 111, Issue 2, pp. 447–456). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.019>
- Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., & Andriantsitohaina, R. (2006). Endothelial function and cardiovascular disease: Effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radical Research*, 40(10), 1054–1065. <https://doi.org/10.1080/10715760600823128>
- Pinelo, M., Arnous, A., & Meyer, A. S. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 17, Issue 11, pp. 579–590). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.05.003>

- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 97, pp. 55–74). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Prakash, M., Basavaraj, B. v., & Chidambara Murthy, K. N. (2019). Biological functions of epicatechin: Plant cell to human cell health. In *Journal of Functional Foods* (Vol. 52, pp. 14–24). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.10.021>
- Rezzani, R., Bonomini, F., Tengattini, S., Fabiano, A., & Bianchi, R. (2008). Atherosclerosis and oxidative stress. *Histology and Histopathology*, 23(3), 381–390. <https://doi.org/10.14670/HH-23.381>
- Rodríguez, K., & Céspedes, E. (1999, August). Estrés oxidativo y envejecimiento. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 18(2), 67–76. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03001999000200001
- Ruggieri, L., Cadena, E., Martínez-Blanco, J., Gasol, C. M., Rieradevall, J., Gabarrell, X., Gea, T., Sort, X., & Sánchez, A. (2009). Recovery of organic wastes in the Spanish wine industry. Technical, economic and environmental analyses of the composting process. *Journal of Cleaner Production*, 17(9), 830–838. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2008.12.005>
- Sant'Anna, V., Brandelli, A., Marczak, L. D. F., & Tessaro, I. C. (2012). Kinetic modeling of total polyphenol extraction from grape marc and characterization of the extracts. *Separation and Purification Technology*, 100, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.09.004>
- Saunders, C. (2009). The anti-proliferative effect of different tomato varieties on the human colon adenocarcinoma cells. *Bioscience Horizons*, 2(2), 172–179. <https://doi.org/10.1093/biohorizons/hzp020>
- Scicchitano, P., Cortese, F., Gesualdo, M., de Palo, M., Massari, F., Giordano, P., & Ciccone, M. M. (2019). The role of endothelial dysfunction and oxidative stress in cerebrovascular diseases. In *Free Radical Research* (Vol. 53, Issue 6, pp. 579–595). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10715762.2019.1620939>
- Šebela, D., Turóczy, Z., Olejníčková, J., Kumšta, M., & Sotolář, R. (2017). Effect of ambient sunlight intensity on the temporal phenolic profiles of *Vitis Vinifera* L. Cv. chardonnay during the ripening season-A field study. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 38(1), 94–102. <https://doi.org/10.21548/38-1-1038>
- Shebeko, S. K., Zupanets, I. A., Popov, O. S., Tarasenko, O. O., & Shalamay, A. S. (2018). Effects of quercetin and its combinations on health. In *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease* (pp. 373–394). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813006-3.00027-1>
- Silva, M. L., Macedo, A. C., & Malcata, F. X. (2000). Review: Steam distilled spirits from fermented grape pomace Revision: Bebidas destiladas obtenidas de la fermentación del orujo de uva. *Food Science and Technology International*, 6(4), 285–300. <https://doi.org/10.1177/108201320000600403>
- Singh, R. P., Tyagi, A. K., Dhanalakshmi, S., Agarwal, R., & Agarwal, C. (2004). Grape seed extract inhibits advanced human prostate tumor growth and angiogenesis and upregulates insulin-like growth factor binding protein-3. *International Journal of Cancer*, 108(5), 733–740. <https://doi.org/10.1002/ijc.11620>
- Singleton, Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Singleton, & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3).
- Smid, S. D., Maag, J. L., & Musgrave, I. F. (2012). Dietary polyphenol-derived protection against neurotoxic β -amyloid protein: From molecular to clinical. *Food and Function*, 3(12), 1242–1250. <https://doi.org/10.1039/c2fo30075c>
- Soler-Rivas, C., Espín, J. C., & Wichers, H. J. (2000). An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis*, 11(5), 330–338. [https://doi.org/10.1002/1099-1565\(200009/10\)11:5<330::AID-PCA534>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/1099-1565(200009/10)11:5<330::AID-PCA534>3.0.CO;2-G)
- Soleymani, S., Habtemariam, S., Rahimi, R., & Nabavi, S. M. (2020). The what and who of dietary lignans in human health: Special focus on prooxidant and antioxidant effects. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 106, pp. 382–390). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.015>

- Spigno, G., Marinoni, L., & Garrido, G. D. (2017). State of the Art in Grape Processing By-Products. In *Handbook of Grape Processing By-Products: Sustainable Solutions* (pp. 1–27). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809870-7.00001-6>
- Spigno, G., Tramelli, L., & de Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021>
- Subramanian, A. P., John, A. A., Vellayappan, M. v., Balaji, A., Jaganathan, S. K., Supriyanto, E., & Yusof, M. (2015). Gallic acid: Prospects and molecular mechanisms of its anticancer activity. In *RSC Advances* (Vol. 5, Issue 45, pp. 35608–35621). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c5ra02727f>
- Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D. A., & Garcia-Viguera, C. (2014). Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 15, Issue 9, pp. 15638–15678). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms150915638>
- Thangasamy, T., Sittadjody, S., & Burd, R. (2009). Quercetin. a Potential Complementary and Alternative Cancer Therapy. In *Complementary and Alternative Therapies and the Aging Population* (pp. 563–584). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374228-5.00027-5>
- Tkacz, K., Wojdyło, A., Nowicka, P., Turkiewicz, I., & Golis, T. (2019). Characterization in vitro potency of biological active fractions of seeds, skins and flesh from selected *Vitis vinifera* L. cultivars and interspecific hybrids. *Journal of Functional Foods*, 56, 353–363. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.03.029>
- Torres, N., Antolín, M. C., & Goicoechea, N. (2018). Arbuscular mycorrhizal symbiosis as a promising resource for improving berry quality in grapevines under changing environments. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 9, p. 897). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00897>
- Tsutsui, H., Kinugawa, S., & Matsushima, S. (2011). Oxidative stress and heart failure. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 301(6), 2181–2190. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00554.2011>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- van Leeuwen, C., Friant, P., Choné, X., Tregoat, O., Koundouras, S., & Dubourdieu, D. (2004). Influence of Climate, Soil, and Cultivar on Terroir. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55(3).
- van Mierlo, L. A. J., Zock, P. L., van der Knaap, H. C. M., & Draijer, R. (2010). Grape polyphenols do not affect vascular function in healthy men. *Journal of Nutrition*, 140(10), 1769–1773. <https://doi.org/10.3945/jn.110.125518>
- Vatai, T., Škerget, M., & Knez, Ž. (2009). Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, 90(2), 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.06.028>
- Wohlgemuth, R., Twardowski, T., & Aguilar, A. (2021). Bioeconomy moving forward step by step – A global journey. *New Biotechnology*, 61, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.11.006>
- Xia, E.-Q., Deng, G.-F., Guo, Y.-J., & Li, H.-B. (2010). Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2), 622–646. <https://doi.org/10.3390/ijms11020622>
- Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M., & Matar, C. (2018). The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients*, 10(11), 1618. <https://doi.org/10.3390/nu10111618>
- Yalcin, D., Ozcalik, O., Altioek, E., & Bayraktar, O. (2008). Characterization and recovery of tartaric acid from wastes of wine and grape juice industries. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 94(3), 767–771. <https://doi.org/10.1007/s10973-008-9345-z>
- Yang, X., & Jiang, X. (2015). Antifungal activity and mechanism of tea polyphenols against *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnology Letters*, 37(7), 1463–1472. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1820-6>