



UNIVERSIDAD FRANCISCO DE VITORIA

Escuela Internacional de Doctorado

Tesis doctoral

**Doctorado en Biotecnología, Medicina y
Ciencias Biosanitarias**



Universidad
Francisco de Vitoria
UFV Madrid
*Escuela Internacional
de Doctorado*

**“Caracterización del contenido en polifenoles
del mosto de uva de la variedad Airén y
estudio de su potencial frente a leucemia:
revisión sistemática y meta-análisis.”**

Doctorando
Director

Daniel Jesús García Martínez
Dr Cruz Santos Tejedor
Pozuelo de Alarcón, 2020.

Agradecimientos.

En estas líneas me gustaría mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido al desarrollo de esta tesis doctoral.

Primeramente, me gustaría agradecer a Dios el haber creado el mundo, la vida y los hombres, y habernos dotado de inteligencia para ser conscientes de las maravillas existentes, y la capacidad de poder descubrir a través de las ciencias las leyes que conforman el universo y el mundo.

En segundo lugar, deseo dar las gracias a la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad Francisco de Vitoria por la oportunidad que me ha dado para poder realizar esta Tesis Doctoral. En especial, me gustaría mostrar especial agradecimiento a mi director, Cruz Santos Tejedor, gracias por su dedicación en esta Tesis Doctoral, por todo lo que me ha enseñado, por su ayuda, su supervisión y seguimiento. También agradecer al Dr Javier Calzada Funes, por haber sido co-director durante un tiempo importante de su desarrollo, porque sin ellos este trabajo no hubiese sido posible.

Gracias también a la Dra María Posada Ayala, por su ayuda con el manejo y análisis de datos de espectrometría de masas, al Dr Carlos Martín Saborido por sus enseñanzas en el desarrollo del meta-análisis, y a la Dra María Arroyo-Hernández, por su apoyo y enseñanza de las herramientas estadísticas. A todos, gracias por su implicación y dedicación en esta tesis doctoral, por su esfuerzo en dar la mejor formación en el ámbito académico y de la investigación.

También me gustaría agradecer a Mostos Españoles por la financiación de esta investigación desde 2014 hasta 2019.

Me gustaría agradecer también a los compañeros la Facultad de Ciencias Experimentales, en especial a Blanca González, Francisco Moreno, Lourdes Félix, Elena Pascual, Nuria Peralta y Francisca Arroyo, por su amistad, su paciencia conmigo en el día a día y por los ánimos recibidos. Además, agradecer en particular al grupo de Microbiología de la facultad, formado por Dra Estela Pérez, Dra Olga Zafra, Raquel Francisco y Dra Alba Blesa, por hacer que el trabajo resulte más ameno, por su apoyo y por las experiencias compartidas durante mi estancia en el laboratorio. A todas aquellas personas que han

pasado por el Laboratorio de Investigación de la Facultad durante la realización de esta Tesis Doctoral, en particular a mis amigos; Ignacio Baselga y Elena Jurío Font, por convertir el laboratorio en un lugar de trabajo en el que da gusto estar.

Tampoco quiero dejar de nombrar a mis compañeros doctorandos; María P, Alejandra C, Alejandro C, Gonzalo y Marc, por los momentos compartidos, y desearles también a ellos que realicen un buen trabajo de investigación.

Finalmente, a mi familia: a mis padres, hermanos y hermanas, así como mis tíos y primos, por su ánimo y comprensión durante este tiempo. Agradecer también a mis amigos, en especial Carlos Pardo, Álvaro Camino, Alberto Corbacho, Alberto Domínguez, Carlos Lorenzo, Javier Aguirre, Javier Iglesias, Paloma Sánchez, María Guillén y Cristina Pérez por su apoyo, su comprensión, paciencia y ánimo en los momentos difíciles, por creer en mí y por estar siempre a mi lado, en los buenos y en los malos momentos.

A todos vosotros, MUCHAS GRACIAS.

Resumen de Abreviaturas

Nombre	Abreviatura
Acetonitrilo	ACN
Agua milliQ	mQH ₂ O
Análisis de la Varianza	ANOVA
Analizador tipo cuadrupolo	Q
Analizadores en tándem: cuadrupolo-tiempo de vuelo	QTOF
Analizadores en tándem: Cuadrupolo-trampa iónica	QTRAP
Concentración de extracto o de polifenol necesaria para neutralizar el 50% del DPPH añadido en la reacción	IC ₅₀
Cromatografía líquida de alta resolución	HPLC
Detector por Diodo Array	DAD
Di(fenil)-(2,4,6-trinitrofenil)iminoazanio	DPPH
Equivalentes de ácido gálico	GAE
Especies reactivas de oxígeno	ROS
Espectrometría de masas	MS
Estadísticas de la Organización Mundial de Alimentos	FAOSTAT
Extractos de polifenoles de uva	GPE
Grado brix	°Brix
Ionización por <i>electrospray</i>	ESI
Leucemia linfocítica aguda	LLA
Leucemia linfocítica crónica	CLL
Leucemia mieloide aguda	LMA
Leucemia mieloide crónica	LMC
Límite de cuantificación	LOQ
Límite de detección	LOD
Media de riesgo	OR
Método elución en gradiente (HPLC)	MEG
Método elución isocrático (HPLC)	MEI
Ministerio de Agricultura y Medio Ambiente	MAGRAMA
Mosto concentrado decolorado	MCD
Mosto concentrado normal	MCN
Politetrafluoroetileno	PFTE
Ratio de riesgo	RR
Revoluciones por minuto	RPM
Siglas para definir la pregunta de investigación principal para el desarrollo de un meta-análisis: Población, intervención, comparación, resultado.	PICO
Superficie agraria útil	SAU
Test estadístico de análisis de varianza.	ANOVA
Ultravioleta	UV

ÍNDICE

Título	Página
1. Introducción.	1
<u>1.1. La vid.</u>	1
1.1.1. Historia y distribución geográfica de la vid.	1
1.1.2. El cultivo de la vid en el mundo y en España.	3
1.1.3. La vid en Castilla-La Mancha.	8
1.1.3.1. Airén.	10
1.1.3.2. Gewürztraminer.	11
1.1.3.3. Sauvignon blanc.	11
1.1.3.4. Verdejo.	12
1.1.3.5. Tempranillo.	12
1.1.4. El mosto de uva.	14
1.1.4.1. Aplicaciones industriales del mosto de uva.	15
<u>1.2. Polifenoles.</u>	17
1.2.1. Definición y síntesis de polifenoles.	17
1.2.2. Estructura química y tipos de compuestos polifenólicos.	19
1.2.2.1. No Flavonoides.	21
1.2.2.2. Flavonoides.	22
1.2.3. Polifenoles de interés en la uva.	24
1.2.4. Polifenoles y salud humana.	25
1.2.4.1. Polifenoles y cáncer.	27
1.2.4.2. Polifenoles y leucemia.	28
<u>1.3. Revisión sistemática y meta-análisis.</u>	30
2. Objeto y alcance de la tesis.	35
2.1. <u>Objetivo general.</u>	35
2.2. <u>Objetivos específicos.</u>	35
3. Materiales y métodos.	39
<u>3.1. Materiales.</u>	39
3.1.1. Muestras de mosto.	39
3.1.2. Reactivos y compuestos polifenólicos.	40
3.1.3. Análisis estadístico.	42
<u>3.2. Métodos.</u>	44
3.2.1. Método de concentración del mosto de uva.	44
3.2.2. Extracción de polifenoles.	45
3.2.2.1. Extracción directa con solventes.	45
3.2.2.2. Extracción a partir de mosto solidificado con arena de sílice.	46
3.2.2.3. Extracción a partir de muestras de mosto liofilizado.	47
3.2.3. Cuantificación de polifenoles mediante espectrofotometría.	47

3.2.4. Determinación de la capacidad antioxidante con DPPH.	47
3.2.5. Análisis de los extractos de polifenoles de mosto mediante HPLC	48
3.2.6. Identificación y cuantificación de polifenoles mediante espectrometría de masas (MS).	51
3.2.6.1. Base de datos de polifenoles para su cuantificación mediante espectrometría de masas (MS).	52
3.2.7. Metodología de revisión sistemática y meta-análisis.	53
3.2.7.1. Estrategia de búsqueda bibliográfica.	53
3.2.7.2. Revisión por pares.	54
3.2.7.3. Extracción de datos y criterios de selección.	54
3.2.7.4. Análisis estadístico.	55
4. Resultados.	59
4.1. Extracción y análisis de polifenoles del mosto.	59
4.1.1. Extracción de polifenoles de forma directa con solventes.	59
4.1.2. Extracción de polifenoles sólido-líquido.	63
4.1.3. Extracción de polifenoles de muestras de mosto liofilizado.	64
4.2. Cuantificación de polifenoles totales en los mostos por técnicas espectrofotométricas.	67
4.3. Análisis de la capacidad antioxidante del mosto y los extractos de polifenoles.	71
4.4. Caracterización de los polifenoles extraídos del mosto mediante HPLC.	73
4.4.1. Separación de polifenoles por HPLC con método de elución isocrático.	73
4.4.2. Separación de polifenoles por HPLC con métodos de elución en gradiente.	77
4.5. Análisis cuantitativo de los polifenoles del mosto mediante espectrometría de masas.	82
4.5.1. Creación de una base de datos para la identificación de polifenoles mediante HPLC-MS.	82
4.5.2. Selección de polifenoles y validación del método de análisis.	85
4.5.3. Detección y cuantificación de los polifenoles seleccionados en extractos de mosto de diferentes varietales mediante HPLC-MS.	88
4.5.4. Detección y cuantificación de polifenoles seleccionados en mosto concentrado Airén de diferente grado Brix mediante HPLC-MS.	101
4.5.4.1. Cuantificación de polifenoles en muestras de mosto concentrado normal (MCN).	101
4.5.4.2. Cuantificación de polifenoles en muestras de mosto concentrado decolorado (MCD).	107
4.6. Revisión sistemática y meta-análisis sobre el efecto de los polifenoles de uva en leucemia.	114
4.6.1. Estrategia de búsqueda bibliográfica y extracción de datos	115
4.6.2. Descripción de los resultados buscados en el meta-análisis.	117
4.6.3. Evaluación del riesgo de sesgo.	120
4.6.4. Resultados del meta-análisis.	121
4.6.4.1. Efecto de polifenoles de uva en la proliferación de células de leucemia humana	121

4.6.4.2. Efecto de los polifenoles de uva en la proliferación de células de leucemia humanas de diferente linaje celular	123
4.6.4.3. Efecto de los polifenoles de uva en el arresto del ciclo celular en las células de leucemia.	127
4.6.4.4. Estudio de los mecanismos de inducción de apoptosis en líneas celulares de leucemia por efecto de los polifenoles de uva	129
5. Discusión	133
6. Conclusiones	147
6.1. Prospectiva.	148
7. Referencias Bibliográficas.	Iii
8. Anexos.	xxiii
8.1. Tablas.	xxiii
8.1. Figuras.	xxxii

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Mapa de la distribución de la vid en el Mediterráneo y Próximo Oriente.	2
Figura 2. Área actual del cultivo de la vid según las latitudes geográficas.	4
Figura 3. Evolución de la producción de uva en el periodo 2007-2016 por los 10 países principales a nivel mundial.	5
Figura 4. Evolución de la producción de uva en España en el periodo 1961-2016.	6
Figura 5. Distribución del área dedicada a cultivos leñosos en España en 2019.	6
Figura 6. Representación gráfica de la superficie cultivada (%) en España de las diferentes variedades de uva.	8
Figura 7. Hectáreas cultivadas de viñedo en las Comunidades Autónomas.	9
Figura 8. Racimo de uva de la variedad Airén.	10
Figura 9. Racimo de uva de la variedad Gewürztraminer.	11
Figura 10. Racimo de uva de la variedad Sauvignon blanc.	11
Figura 11. Racimo de uva de la variedad Verdejo.	12
Figura 12. Racimo de uva de la variedad Tempranillo.	12
Figura 13. Rutas metabólicas de síntesis de polifenoles a partir del ácido shikímico y de la ruta de los poliacetatos.	18
Figura 14. Ruta general de síntesis de los fenil-propanoides.	19
Figura 15. Clasificación general de polifenoles en base a su estructura química.	20
Figura 16. Esquema del proceso de concentración del mosto llevado a cabo en Mostos Españoles S.A.	44
Figura 17 Diagrama de la composición de la fase móvil en el método de elución MEG4 seleccionado para la separación de polifenoles por HPLC.	51
Figura 18. Cromatograma HPLC a 210nm del extracto de polifenoles de la muestra control resueltos con el método de elución isocrático MEI3.	60
Figura 19. Cromatogramas HPLC a 210nm de extractos de mosto concentrado normal Airén en las distintas etapas del proceso de concentración industrial.	62
Figura 20. Cromatograma HPLC a 210nm de los polifenoles de la muestra control extraídos por el método de arena de sílice.	63
Figura 21. Cromatogramas HPLC a 210nm de los polifenoles extraídos por el método de solidificación con arena de sílice resueltos con el método de elución MEI3.	64
Figura 22. Cromatograma HPLC a 210nm del extracto de la muestra control obtenido con el método de extracción por liofilización y eluido con el método MEI3.	65
Figura 23. Cromatogramas HPLC a 210nm de los extractos de polifenoles obtenidos a partir dl mosto liofilizado de las variedades.	66
Figura 24. Concentración de polifenoles totales, expresada en equivalentes de ácido gálico (GAE) en las muestras de mosto y los extractos en los diferentes varietales en estudio.	68
Figura 25. Concentración de polifenoles totales, expresada en equivalentes de ácido gálico (GAE) en las muestras de mosto normal Airén en diferentes etapas del proceso de concentración.	69
Figura 26. Concentración de polifenoles totales, expresada en equivalentes de ácido gálico (GAE) en las muestras de mosto decolorado Airén en diferentes etapas del proceso de concentración.	70

Figura 27. Cromatogramas HPLC-DAD a 210nm obtenidos con la mezcla patrón de polifenoles resueltos con el método de elución isocrático MEI1a(A), MEI1b(B), MEI1c (C) y MEI1d (D).	74
Figura 28. Cromatogramas HPLC-DAD a 210nm de la mezcla patrón de polifenoles resueltos con los métodos de elución isocráticos MEI1e (A), MEI1f (B).	75
Figura 29. Cromatogramas HPLC-DAD a 210nm de la mezcla patrón de polifenoles resueltos con los métodos de elución isocráticos MEI2a (A), MEI2b (B) y MEI3 (C).	76
Figura 30. Cromatogramas HPLC-DAD a 210nm de la mezcla patrón de polifenoles obtenidos con los métodos de elución en gradiente MEG1 (A), MEG2 (B), MEG3 (C) y MEG4 (D) Por orden de elución: ácido gálico (GA), catequina (CH), epicatequina (EP), ácido cafeico (CA), ácido vanílico (VA), polidatina (PLD) y quercetina (QC).	78
Figura 31. Cromatogramas de extractos de polifenoles de los cinco varietales de mosto.	80
Figura 32. Cromatogramas de extractos de polifenoles de la variedad Airén en las distintas etapas del proceso industrial.	81
Figura 33. Espectros de masas de los fragmentos identificados en los extractos de mosto fresco Airén obtenidos en el modo de ionización positivo (A) y negativo (B).	89
Figura 34. Representación gráfica de las concentraciones de ácidos hidroxicinámicos en los extractos de mosto.	91
Figura 35. Representación gráfica de las concentraciones de ácidos hidroxibenzoicos en los extractos de mosto.	94
Figura 36. Representación gráfica de las concentraciones de estilbenos en los extractos de mosto.	95
Figura 37. Representación gráfica de las concentraciones de los flavonoides en los extractos de mosto.	98
Figura 38. Representación gráfica del perfil polifenólico de los distintos extractos de varietales de mosto.	99
Figura 39. Representación gráfica de las concentraciones de ácidos fenólicos en los extractos de mosto de las tres distintas etapas industriales del mosto normal.	103
Figura 40. Representación gráfica de las concentraciones de estilbenos en los extractos de mosto de las tres distintas etapas industriales del mosto normal.	104
Figura 41. Representación gráfica de las concentraciones de flavonoides en los extractos de mosto de las tres distintas etapas industriales del mosto normal.	106
Figura 42. Representación gráfica de las concentraciones de ácidos fenólicos en los extractos de mosto de las tres distintas etapas industriales del mosto decolorado.	109
Figura 43. Representación gráfica de las concentraciones de estilbenos en los extractos de mosto de las tres distintas etapas industriales del mosto decolorado.	110
Figura 44. Representación gráfica de las concentraciones de flavonoides en los extractos de mosto de las tres distintas etapas industriales del mosto decolorado.	112
Figura 45. Diagrama de flujo PRISMA del proceso de selección de trabajos a incluir en la síntesis cuantitativa sobre el efecto de los polifenoles de uva en la proliferación de células de leucemia humana.	116
Figura 46. Resultados del meta-análisis sobre el efecto de polifenoles de uva en la proliferación de células de leucemia humana agrupados por tipo de polifenoles	122
Figura 47. Resultados del meta-análisis sobre el efecto de polifenoles de uva en la proliferación de células de leucemia humana agrupadas por linaje celular.	124
Figura 48. Resultados del meta-análisis sobre el efecto de polifenoles de uva en la detención del ciclo celular G0 en células de leucemia.	128
Figura I Anexos. Espectros de MS del extracto del mosto fresco Gewürztraminer obtenidos en el modo de ionización negativo (A) y modo de ionización positivo (B).	xxxii

Figura II Anexos. Espectros de MS del extracto del mosto fresco Sauvignon blanc obtenidos en el modo de ionización negativo (A) y modo de ionización positivo (B).	xxxiii
Figura III Anexos. Espectros de MS del extracto del mosto fresco Verdejo obtenidos en el modo de ionización negativo (A) y modo de ionización positivo (B).	xxxiv
Figura IV Anexos. Espectros de MS del extracto del mosto fresco Tempranillo obtenidos en el modo de ionización negativo (A) y modo de ionización positivo (B).	xxxv

TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Reactivos químicos y solventes.	40
Tabla 2. Compuestos polifenólicos comerciales utilizados.	41
Tabla 3. Criterios de relevancia adoptado basados en el valor de "fold of change".	43
Tabla 4. Métodos de elución por el método isocrático ensayadas en el HPLC.	49
Tabla 5. Condiciones de elución en gradiente ensayadas en el HPLC.	50
Tabla 6. Ecuaciones de la recta para cada polifenol analizado.	60
Tabla 7. Cuantificación (mg/L) de los polifenoles extraídos de la muestra control con los solventes estudiados.	61
Tabla 8. Cuantificación de polifenoles extraídos con metanol a partir de la muestra solidificada por arena de sílice.	63
Tabla 9. Cuantificación de polifenoles extraídos con metanol de la muestra liofilizada.	65
Tabla 10. Contenido total de polifenoles en los varietales de mosto y sus extractos, expresados en mg/L GAE.	68
Tabla 11. Concentración de las distintas etapas de concentración del mosto normal y sus extractos, expresados en mg/L GAE.	69
Tabla 12. Concentración de polifenoles totales en las distintas etapas de concentración del mosto decolorado y sus extractos, expresados en mg/L GAE.	70
Tabla 13. Capacidad antioxidante de los mostos y los extractos de polifenoles de los diferentes varietales de uva estudiados.	72
Tabla 14. Capacidad antioxidante de los mostos y los extractos de polifenoles de las diferentes etapas del proceso de concentración industrial	72
Tabla 15. Parámetros para analizar los 23 polifenoles seleccionados mediante espectrometría de masas. Q1, relación carga/masa (Da) del polifenol que se desea analizar.	84
Tabla 16. Parámetros para analizar los 16 polifenoles seleccionados mediante espectrometría de masas. Q1, relación carga/masa (Da) del polifenol que se desea analizar	85
Tabla 17. Datos de calibración de los polifenoles seleccionados para su cuantificación y familia a la que pertenecen.	87
Tabla 18. Medidas de concentración y comparación estadística de los ácidos hidroxicinámicos estudiados en los extractos de los varietales de mosto.	91
Tabla 19. Medidas de concentración y comparación estadística de los ácidos hidroxibenzoicos estudiados en los extractos de los varietales de mosto.	93
Tabla 20. Medidas de concentración y comparación estadística de los estilbenos estudiados en los extractos de los varietales de mosto.	95
Tabla 21. Medidas de concentración y comparación estadística de los flavonoides estudiados en los extractos de los varietales de mosto.	97
Tabla 22. Concentración de ácidos fenólicos en extractos de mosto normal en las tres etapas del proceso de concentración.	102
Tabla 23. Concentración de estilbenos en extractos de mosto normal en las tres etapas del proceso de concentración.	104
Tabla 24. Concentración de flavonoides en extractos de mosto normal en las tres etapas del proceso de concentración.	105
Tabla 25. Concentración de ácidos fenólicos en extractos de mosto decolorado en las tres etapas del proceso de concentración.	108

Tabla 26. Concentración de estilbenos en extractos de mosto decolorado en las tres etapas del proceso de concentración.	110
Tabla 27. Concentración de flavonoides en extractos de mosto decolorado en las tres etapas del proceso de concentración.	111
Tabla 28. Artículos científicos incluidos en el meta-análisis, O1 (resultado 1): efecto de polifenoles específicos de la uva sobre la proliferación de células de leucemia. O2 (resultado 2): efecto de los polifenoles de la uva sobre la proliferación de células leucemia de distinto origen. O3 (resultado 3): Efecto de los polifenoles de la uva sobre la parada del ciclo celular).	117
Tabla 29. Artículos no-incluidos en el meta-análisis y la causa de su exclusión.	118
Tabla 30. Artículos incluidos en el meta-análisis que muestran el número de experimentos útiles para la extracción de datos, ordenados por tipo de células de leucemia y polifenoles.	120
Tabla I Anexos. Compuestos polifenólicos candidatos a estar presentes en los mostos de uva.	xxiii
Tabla II Anexos. Selección de 56 polifenoles presentes en uva con los parámetros más relevantes para su identificación y análisis mediante espectrometría de masas.	xxviii
Tabla III Anexos. Clasificación de los distintos indicadores de apoptosis en los artículos incluidos en el meta-análisis.	xxxi

Resumen

El mosto de uva es un producto rico en azúcares, minerales y vitaminas, que además contiene compuestos bioactivos denominados polifenoles. El mosto es la base para la producción de vinos, pero además se utiliza en industria alimentaria para la producción de bebidas y alimentos para deportistas y niños principalmente. El mosto concentrado industrialmente, es el producto que se comercializa para este tipo de aplicaciones, ya que facilita su conservación y transporte.

Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas que se ha demostrado tienen capacidad antioxidante. Esta característica les ha hecho objeto de numerosos estudios y se ha demostrado que la inclusión de alimentos ricos en polifenoles en la dieta proporciona múltiples beneficios para la salud humana y previene el desarrollo de enfermedades.

El objetivo de esta tesis es estudiar el contenido en polifenoles del mosto de uva de la variedad Airén y determinar si el proceso de concentración del mosto afecta a estos compuestos. Para ello, se ha realizado un estudio comparativo de los polifenoles presentes en mostos de diferentes variedades de uva (Airén, Gewürztraminer, Sauvignon blanc, Verdejo y Tempranillo) y del mosto Airén en diferentes etapas de concentración. Se ha establecido un método de extracción de polifenoles de mosto, se han caracterizado mediante HPLC y 16 de ellos (12 no flavonoides y 4 flavonoides) se han cuantificado utilizando la técnica de HPLC-MS.

Los resultados obtenidos indican, que el perfil de los polifenoles estudiados es muy similar en todos los mostos analizados, si bien cabe destacar el alto contenido en catequina y quercetina en el mosto Airén. Sin embargo, al analizar la capacidad antioxidante de los extractos polifenólicos, sí que aparecen diferencias significativas, especialmente con la variedad Tempranillo, que genera el mayor efecto antioxidante. También se ha demostrado, que el proceso de concentración industrial afecta negativamente al contenido de polifenoles, llegando a pérdidas de hasta el 66% en algunos compuestos.

Además, se ha hecho una revisión sistemática y meta-análisis para estudiar el efecto de los polifenoles de uva en leucemia, un tipo de cáncer con elevada prevalencia a nivel mundial, especialmente algunas leucemias agudas en población infantil. Los resultados obtenidos indican, que los polifenoles de uva inhiben la proliferación de células tumorales de leucemia humanas cultivadas *in vitro*, en especial en líneas celulares derivadas de células mieloides y de monocitos.

Summary

Grape must is a product rich in sugars, minerals, and vitamins, which also contains bioactive compounds named polyphenols. Grape must is the base ingredient in wine production, but it is also used in the food industry to produce foods and drinks mainly for athletes and children. Industrially concentrated must is the product marketed for these uses due to its ease of preservation and transport.

Polyphenols are secondary plant metabolites with antioxidant activity. This characteristic has prompted numerous studies which collectively have shown that dietary inclusion of foods rich in polyphenols provides numerous benefits for human health and prevents development of diseases.

The aim of this thesis is to characterise the polyphenol content in grape must of the Airén variety and to determine whether the process of concentration affects it. To this end, a comparative study of the polyphenol content profiles of musts of different grape varieties (Airén, Gewürztraminer, Sauvignon Blanc, Verdejo, and Tempranillo) was carried out, as well as of the Airén must at different stages of concentration. A method for polyphenol extraction from grape must and subsequent high performance liquid chromatography (HPLC) characterisation was established, and 16 species (12 non-flavonoids and 4 flavonoids) were quantified by mass spectrometry (MS).

Our results show that polyphenol content profiles are remarkably similar across all the musts analysed, although the high content of catechin and quercetin in Airén must is noteworthy. However, significant differences were observed when analysing the antioxidant activity of polyphenol-containing extracts, with those obtained from the Tempranillo variety exhibiting the largest antioxidant effect. Our data also reveal that the process of industrial concentration reduces polyphenol content, resulting in losses of up to 66% of some compounds.

Additionally, a systematic review and meta-analysis were conducted on the potential effects of polyphenols from grapes on leukaemia, a type of cancer with high prevalence worldwide, especially some types of infantile acute leukaemia. Our results indicate that polyphenols found in grapes inhibit the proliferation of human leukaemia tumour cells *in vitro*, especially myeloid and monocyte cell lines.



INTRODUCCIÓN

1. Introducción.

1.1. La vid.

La vid es un arbusto caducifolio, sarmentoso y trepador que pertenece a la familia de las Vitáceas (*Vitaceae*)¹. La vid, es el nombre común utilizado para designar a todas las plantas que pertenecen al género *Vitis*. Dicho término engloba a todas las especies que se cultivan y que producen bayas, tanto para consumo directo en forma de uva de mesa o pasas, como para la elaboración de otros productos, como mosto o vino. El naturalista sueco Carl Linneo (siglo XVIII), considerado el creador de la nomenclatura binomial para la clasificación taxonómica de los seres vivos, fue quien nombró a la vid como *Vitis vinifera*. El ampelógrafo y profesor Branas afirma que existen en el mundo 61 especies distintas del género *Vitis* y su distribución geográfica se puede explicar en base a la teoría de Wegener, de la deriva de los continentes. Esta es la razón por la cual en la cuenca del Mediterráneo existe solamente la especie *Vitis vinifera*, mientras que en América y en Asia están presentes el resto de especies¹.

1.1.1. Historia y distribución geográfica de la vid.

La vid, es una especie vegetal que estaba presente en el mundo cuando apareció el hombre. El género *Vitis* apareció en Europa hace veintiséis millones de años ocupando posiciones moderadamente cálidas². La dispersión de las semillas por las aves, el viento y el agua diseminó las especies silvestres (*Vitis sylvestris*) hasta las costas asiáticas del Mediterráneo, generando las llamadas *Proles Orientales*. Las especies localizadas en el sur del mar Negro, son las denominadas *Proles Ponticas* y las ubicadas en el occidente del mar Mediterráneo, son las *Proles Occidentales*, que avanzaron hacia el este del mar Mediterráneo (Figura 1) ^{1, 3}.

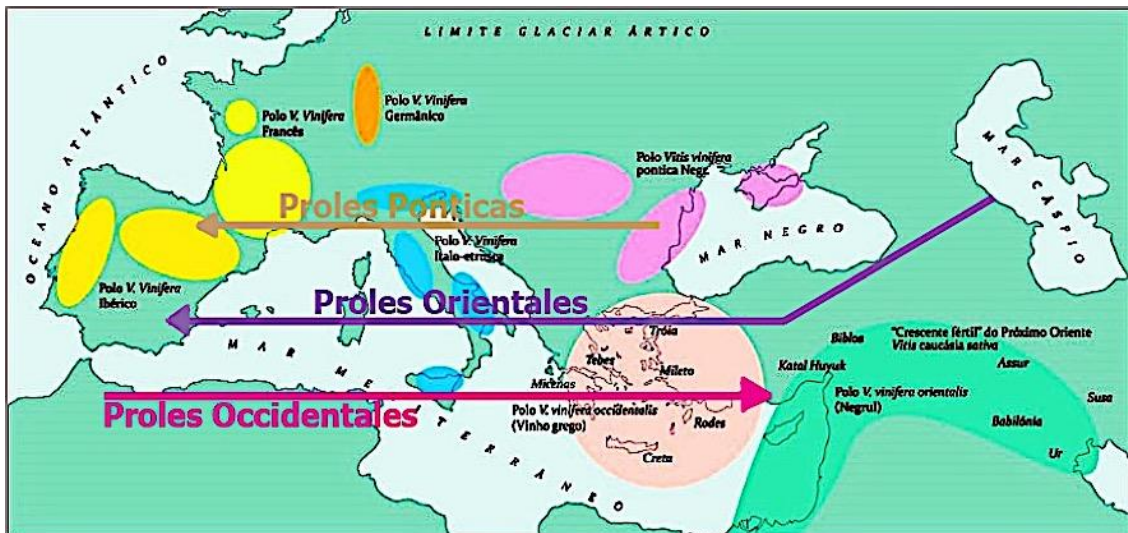


Figura 1. Mapa de la distribución de la vid en el Mediterráneo y Próximo Oriente ^{1, 3}.

A lo largo de la historia, el ser humano ha consumido el fruto de la vid al final del estío, también aprendió a conservarlo en forma de pasas hasta que, de manera involuntaria, se descubrió una nueva bebida, el vino ^{1, 4}. Aprendió a seleccionar y domesticar la vid por un proceso sencillo de selección, teniendo en la actualidad un inmenso patrimonio, con más de dos mil variedades distintas. En Europa, el cultivo de la vid data de la prehistoria. Se han encontrado semillas en yacimientos de asentamientos de la Edad de Bronce en los actuales países de Suiza e Italia, así como en tumbas del antiguo Egipto¹.

El origen del cultivo de la vid tuvo lugar en las primeras comunidades sedentarias en las riberas del mar Mediterráneo y los grandes ríos de Oriente Próximo: el Tigris y el Éufrates. No obstante, hay botánicos que creen que el origen de la uva cultivada en Europa se encuentra en la región del mar Caspio. Afirman que la especie *Vitis vinifera*, de la cual evolucionaron la mayoría de las variedades conocidas actualmente, se cultivó por primera vez en las montañas del Cáucaso alrededor del año 6000 a.C y desde allí se expandieron. Otros historiadores aseguran que los primeros rastros de cultivo de la vid datan de Mesopotamia y Grecia, en torno al 5500 a.C ^{1, 5}. Es por todo ello, que la vid se considera un cultivo propiamente Mediterráneo. Fueron los fenicios, y algo más tarde otros pueblos del mar Egeo, los que, en sus actividades comerciales y colonizadoras, extendieron el cultivo de la vid y la cultura del vino por todo el Mediterráneo^{1, 5}.

En la Península Ibérica, no está claro el origen de la práctica del cultivo de la vid, a pesar de la presencia de viñedos desde el tercer milenio a.C., manifestado por restos de pepitas encontradas en diversos yacimientos arqueológicos y estudios polínicos. Algunos historiadores asignan a los colonos fenicios dichos yacimientos, quienes, en sus primeros asentamientos de Rosas, Ampurias y Sagunto, desde los siglos IX a VIII a.C., introdujeron el vino y, por tanto, el cultivo de la vid. Hay otros historiadores que atribuyen su importación a los tartessos del sur de España, en torno al año 2200 a.C. Por último, hay historiadores que lo asignan a los púnicos en el s. V a.C., posiblemente por las técnicas de regadío que introdujeron en la península ^{1, 5, 6}.

Las variedades de uva que se cultivan en la actualidad en la Península Ibérica proceden de cruzamientos entre las especies *Vitis vinifera* y *Vitis sylvestris*. Son en su mayoría vides con bayas pequeñas y con gran cantidad de antocianos y taninos en las variedades tintas nobles, tales como Cabernet Sauvignon, Merlot o Tempranillo, entre otras. Las variedades blancas son mutaciones albinas de las variedades tintas^{1-3, 6}.

1.1.2. El cultivo de la vid en el mundo y en España.

La vid tiene una gran importancia económica a nivel mundial, ya que existe una elevada producción de uva de numerosas variedades, que se ha destinado, fundamentalmente, a la obtención de productos de uso alimentario, siendo el vino el principal producto generado^{5, 7}. Se cultiva principalmente en las regiones templadas del planeta (entre 10°C-20°C de temperatura media anual), comprendidas entre los 30° y 50° de latitud norte y sur, denominadas las líneas de Wagner, donde están definidas las cuatro estaciones del año (Figura 2) ^{1, 8}. Es una planta de clima mediterráneo, que se encuentra distribuida por toda la región central y sureste de Europa, así como por el suroeste de Asia, la región templada del continente americano y la costa este de Australia³. Las regiones vitivinícolas más importantes se sitúan en especial en Europa Occidental, los Balcanes, California, Australia, sureste de China, Sudáfrica, Chile y Argentina; todas ellas zonas templadas.

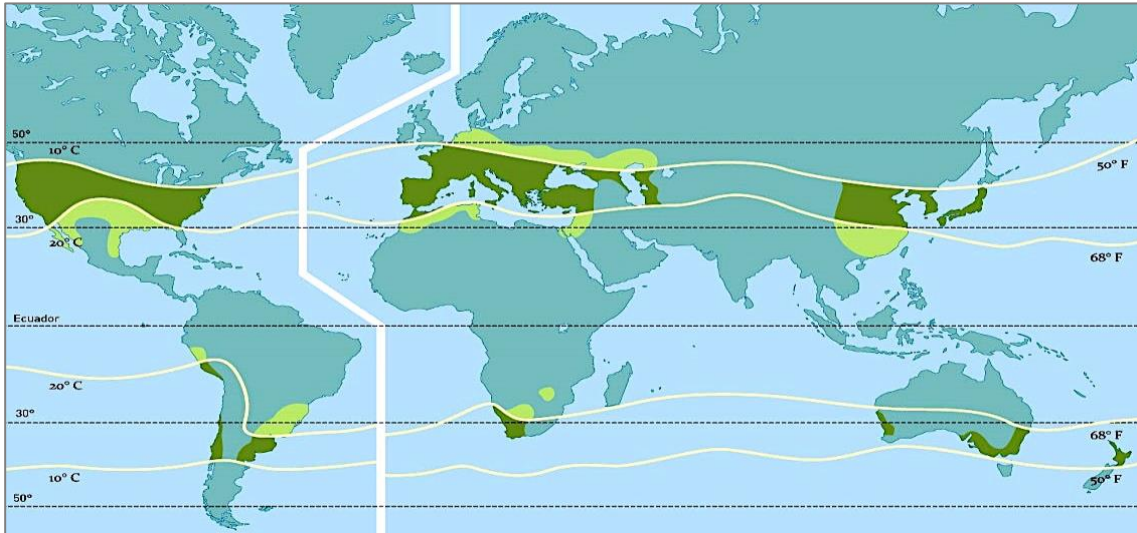


Figura 2. Área actual del cultivo de la vid según las latitudes geográficas. El área cultivada en clima templado está marcada en verde oscuro, en verde claro se representa el área cultivada fuera de clima templado³.

El cultivo de la vid es de gran importancia en un país tradicionalmente vitivinícola como es España, siendo el vino y el mosto los principales productos derivados de la vid ⁹. La superficie de cultivo de vid en España representa el 8.5% a nivel mundial y el 24% dentro de Europa. Según los datos estadísticos de la Organización Mundial de la Alimentación (FAOSTAT), los principales países productores de uva son: China, Estados Unidos, España, Italia, Francia, Turquía, Chile y Argentina (Figura 3) ¹⁰. Muchos de estos países poseen además una industria vinícola muy desarrollada a nivel tecnológico, que les permite producir vinos de alta calidad. La exportación total de uva en 2016 se cifra en 1.735.414 toneladas. De éstas, 610.000 toneladas corresponden a las exportaciones realizadas por los productores italianos, 490.000 toneladas procedían de Chile, 215.000 toneladas de Estados Unidos, mientras que Grecia y España compartieron una cifra de 100.000 toneladas exportadas. Turquía, que se muestra como uno de los mayores productores mundiales de uva, exportó 28.000 toneladas ^{7, 10}. La uva se destina tanto a consumo fresco como a producción de vinos y mosto. En función de los propósitos finales las variedades de interés tendrán un manejo fitotécnico distinto.

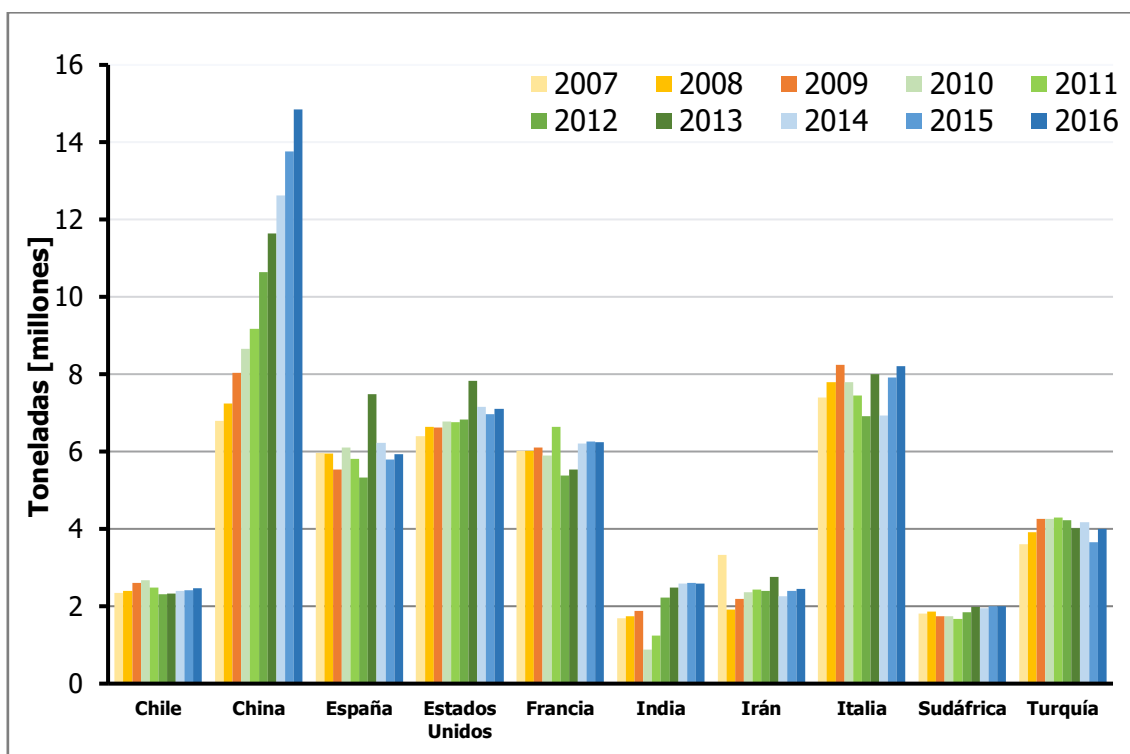


Figura 3. Evolución de la producción de uva en el periodo 2007-2016 por los 10 países productores principales a nivel mundial (datos de FAOSTAT)¹⁰.

En España, es el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), el organismo encargado de la regulación de los cultivos y su comunicación a los organismos internacionales competentes¹¹. El cultivo de la vid es de gran importancia, tanto desde el punto de vista económico como cultural. Durante las últimas décadas, la producción anual de uva se ha incrementado a pesar de haberse ido reduciendo paulatinamente el área de cultivo de vid (Figura 4), posiblemente por las mejoras en las técnicas de cultivo y recolección, al mecanizar todas las etapas del proceso ^{6, 7, 10}.

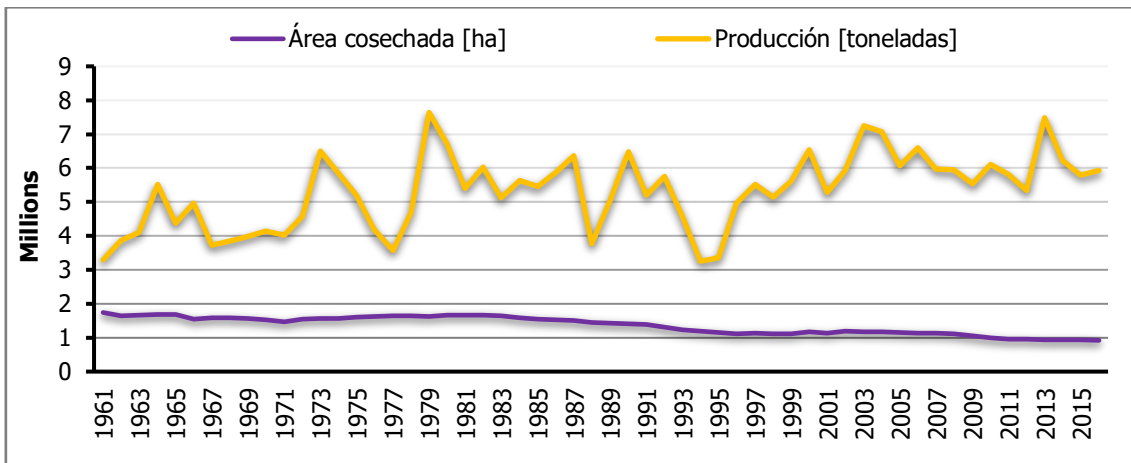


Figura 4. Evolución de la producción de uva en España en el periodo 1961-2016 (datos de FAOSTAT) ^{10, 11}.

En el año 2019, España contabilizaba una superficie de 967.234 hectáreas dedicadas al cultivo de viñedo, lo que representa el 3,3% del total de la superficie agraria útil (SAU) ^{7, 11}. Esto hace que la vid sea el cuarto cultivo más importante del país y el segundo cultivo leñoso más abundante tras el olivar¹¹ (Figura 5).

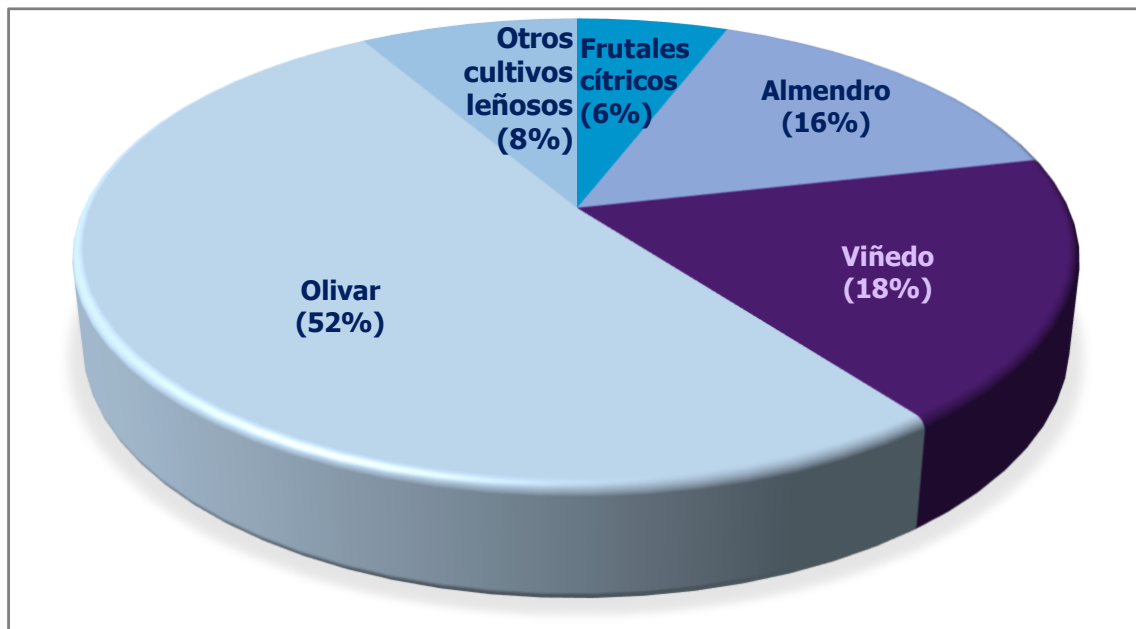


Figura 5. Distribución del área dedicada a cultivos leñosos en España en 2019 (datos del MAGRAMA).

La evolución de la superficie cultivada de vid en España, ha seguido una tendencia decreciente en el caso de las variedades blancas y una tendencia creciente en el caso de las variedades tintas. Del total de uva plantada en España en el año 2016, el 52% fueron variedades tintas, destacando entre ellas la variedad Tempranillo, la cual representa un 21% de la superficie total, siguiéndole por orden de importancia las variedades Bobal, Garnacha tinta, Monastrell, Cabernet Sauvignon, Syrah y Garnacha tintorera. En conjunto, estas siete variedades representan el 90% de la superficie total de variedades tintas y el 46% del total de la superficie de viñedo de nuestro país.

En cuanto a las variedades blancas, la variedad Airén, con 215.546 hectáreas, es el varietal de uva más cultivado en nuestro país. Esta variedad representa el 23% de la superficie total del viñedo existente en España y es la mitad de la superficie cultivada de uva blanca. Destacan, además, los varietales blancos enumerados a continuación: Macabeo, Pardina, Verdejo y Cayetana Blanca. Estas cinco variedades en su conjunto, representan el 73% de la superficie total de variedades blancas, lo que significa un 33% del total de superficie de viñedo de nuestro país ^{9, 10}.

La distribución de los varietales en los últimos quince años ha ido variando; en el caso de los varietales Tempranillo y Syrah la superficie cultivada se ha cuadruplicado desde el año 2000 y; en el caso de la variedad blanca Verdejo, se ha triplicado. De entre las variedades de uva para vinificación que más han visto reducida su superficie de cultivo desde el año 2000, destacan la variedad blanca Airén, con una pérdida de 123.089 hectáreas, la variedad tinta Bobal y la variedad Garnacha tinta. En la figura 6 se muestra la distribución de las variedades de uva cultivadas en España destacando el porcentaje que representan las variedades estudiadas en la presente investigación¹¹.

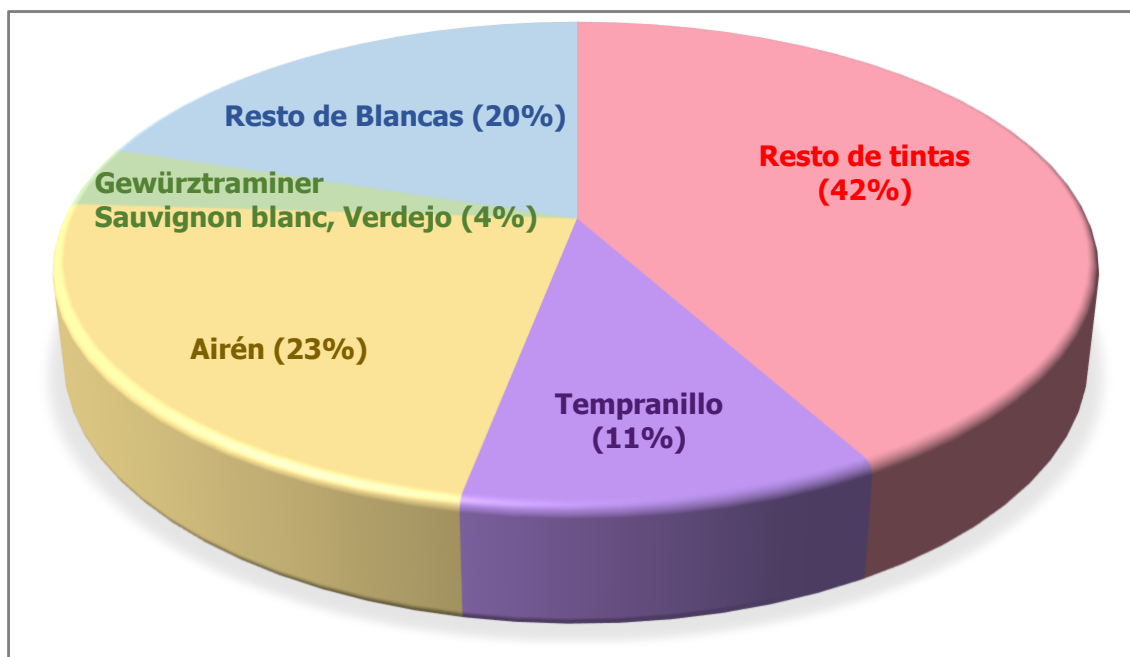


Figura 6. Representación gráfica de la superficie cultivada (%) en España de las diferentes variedades de uva ¹¹.

1.1.3. La vid en Castilla-La Mancha.

El cultivo de la vid se da en todas las Comunidades Autónomas españolas y, aunque la evolución del cultivo no presenta uniformidad entre ellas, cabe destacar a Castilla-La Mancha como la Comunidad Autónoma que más uva produce, según los datos actualizados para el año 2019 por la Subdirección General del Ministerio de Agricultura⁸, ¹¹. La Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha se encuentra situada en el área meridional de la Meseta Central, limitando con las siguientes regiones: al norte, con Madrid y Castilla y León; al sur con Andalucía; al este con Aragón y la Comunidad Valenciana; al oeste con Extremadura y al sureste con la Región de Murcia¹, ¹¹. La extensión dedicada al cultivo de la vid en Castilla-La Mancha es de 468.029 hectáreas y representa el 48% de la superficie total cultivada en España (Figura 7). Las características de su suelo y las condiciones climáticas han convertido Castilla-La Mancha en una zona tradicionalmente vitivinícola, con grandes plantaciones de viñedo y modernas industrias elaboradoras¹. Hay pocas regiones en el mundo que se hayan vertebrado tan claramente en torno a un monocultivo como ésta. No existe en España otra región, salvo La Rioja, con este grado de especialización vitivinícola², ¹².

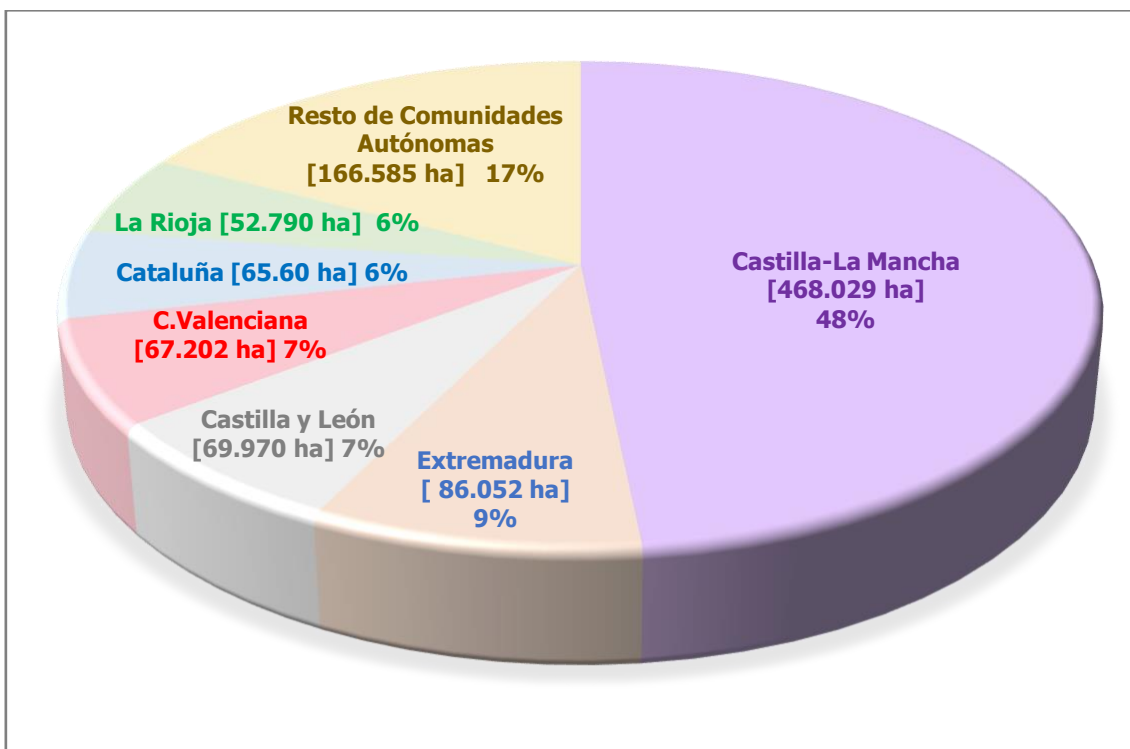


Figura 7. Hectáreas cultivadas de viñedo en las Comunidades Autónomas de España. (datos del Informe MAGRAMA 2019)¹¹.

En el Plan Estratégico del Sector Vitivinícola Regional elaborado por la Universidad de Castilla-La Mancha para la Consejería de Agricultura, se incide en el “carácter vertebrador del viñedo en el territorio de Castilla-La Mancha”¹³. En enero de 2018, el consejero de Agricultura, Medio Ambiente y Desarrollo Rural, Francisco Martínez Arroyo presentó el Plan Estratégico del Sector Vitivinícola de Castilla-La Mancha, que es una clara apuesta por la exportación y la calidad, con el fin de poner en valor los vinos de las denominaciones de origen de Castilla-La Mancha. En la región se cultivan veinticinco variedades de uva diferentes, siendo Airén y Verdejo las variedades más representativas de uva blanca. No obstante, hay otras variedades blancas en menor proporción como Sauvignon blanc y Gewürztraminer. Por ello, se han estudiado también en esta investigación. En cuanto a las variedades tintas, Tempranillo y Bobal son las que ocupan un mayor porcentaje de la superficie cultivada^{9, 13}.

1.1.3.1. Airén.

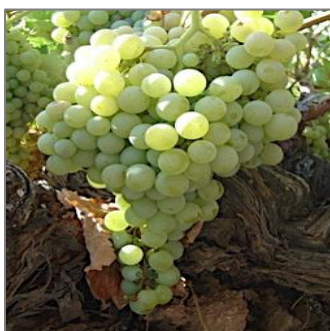


Figura 8. Racimo de uva de la variedad Airén

La primera referencia a una clasificación de las uvas en España se encuentra en la obra escrita por Gabriel Alonso de Herrera en 1513, *Agricultura General*¹⁴, bajo petición del Cardenal Cisneros. La obra recopila la agricultura que se realizaba en el Reino de España en aquella época. En el libro segundo, que trata de la vid, aparecen las primeras referencias a la uva de la variedad Airén, por entonces denominada "Lairén". La variedad de uva blanca Airén es originaria de España y es una de las variedades blancas más cultivadas en el mundo debido a su capacidad de adaptación a climas extremos y secos. Actualmente, la variedad Airén ocupa la mayor parte de la superficie del viñedo español, localizada mayoritariamente en Castilla-La Mancha^{11, 15}. Es la uva blanca más abundante de España, siendo el 49% de toda la superficie ocupada por variedades blancas. En 2019, en esta región se produjeron 44.806 hectolitros de vino y 4.789 hectolitros de mosto a partir de esta variedad de uva¹¹. Es una variedad rústica y fértil, de brote y maduración tardía, adaptada a terrenos áridos y duros, propios de suelos calcáreos, lo que también la hace muy resistente a la sequía. Los viñedos de Airén tienen poca densidad y producen 4,5-6 kg de uva por cepa¹⁶. Se caracteriza por ser una variedad de racimos grades y sueltos con bayas de grosor medio, esféricas, con pulpa blanda y muy jugosas (Figura 8). El mosto de uva Airén es de color amarillo pálido y tiene una concentración de azúcares comprendida entre los 19-21° Brix (gramos de azúcar disuelto por cada 100 gramos de disolución).

La variedad Airén se ha considerado históricamente una uva de baja calidad para producir vinos, porque no genera un perfil aromático complejo⁹. No obstante, en la última década se ha venido utilizando para la elaboración de vinos blancos de las denominaciones de origen La Mancha y Valdepeñas y la producción de alcoholes destilados, como los *brandies* jerezanos. En la actualidad, con el desarrollo de nuevas técnicas de viticultura, se está redescubriendo esta variedad y se está utilizando para la elaboración de nuevos vinos producidos en *coupage* con otras variedades y para la elaboración de mosto concentrado de utilidad en la industria vinícola y el sector alimentario^{2, 17}.

1.1.3.2. Gewürztraminer.

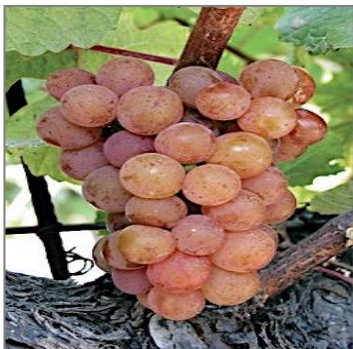


Figura 9. Racimo de uva de la variedad Gewürztraminer

La uva Gewürztraminer es una variedad muy aromática originaria de Alemania, que crece con facilidad en climas fríos (*"gewürz"* significa herbal^{12, 15}). Es una variedad que contiene un nivel alto de azúcares naturales (23° Brix) y confiere a los vinos un olor floral característico. La uva tiene una piel rosada, pero se considera una uva blanca (Figura 9). Este varietal está poco presente en España, con tan solo 72 hectáreas, lo que representa un 0,01% de la superficie cultivada de variedades blancas. Sin

embargo, cabe destacar que el 17% de toda la superficie dedicada a este cultivo se encuentra en Castilla-La Mancha^{9, 11}.

1.1.3.3. Sauvignon blanc.

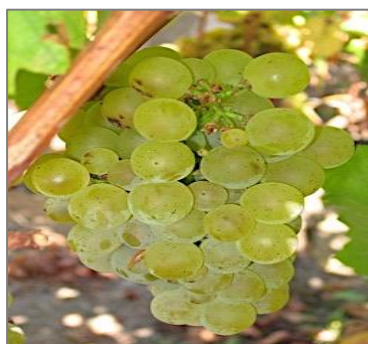


Figura 10. Racimo de uva de la variedad Sauvignon blanc

La variedad Sauvignon blanc descende de la variedad *savagnin*, que proviene de la región de Burdeos, en el suroeste de Francia¹². El nombre surge de la unión entre las palabras francesas salvaje *"sauvage"* y blanca *"blanc"*¹⁵. Es una variedad plantada en numerosos lugares del mundo para la producción de vino blanco, refrescante y seco. Produce uvas con piel de tonalidad verde claro en racimos grandes y sueltos con aromas similares al pasto y a la hierba (Figura 10).

Es una uva con alta acidez y concentración de azúcares similar a otras variedades cultivadas (20° Brix). En España el cultivo de esta variedad ocupa el 1,15% de toda la superficie de las variedades blancas. Se cultiva principalmente en la comunidad de Castilla y León^{9, 11}. En Castilla-La Mancha ocupa una superficie de alrededor de 1200 hectáreas^{9, 11}.

1.1.3.4. Verdejo.



Figura 11. Racimo de uva de la variedad Verdejo.

El varietal Verdejo blanco, o simplemente Verdejo, es una uva blanca originaria de España¹², resultado del cruce entre la variedad *traminer* (también conocida como *savagnin*) y la variedad castellana blanca¹⁵. Esta vid es una planta de porte horizontal, con poco vigor y baja fertilidad. Los racimos son pequeños, al igual que el tamaño de sus bayas (Figura 11), con una producción media de 1,7 kg uva por cepa¹⁶. Es resistente a la sequía y se adapta bien a terrenos poco fértiles y arcillosos. Es una variedad muy sensible al oídio que precisa de podas largas para obtener producciones aceptables. El mosto y la uva son moderadamente ácidos y ligeramente amargos. En España, se cultivan 19.000 hectáreas, que representan un 4,3% de toda la superficie cultivada de variedades blancas. Está presente, sobre todo, en la comunidad de Castilla y León, especialmente extendida en los vinos de Denominación de Origen Rueda. La siguiente región donde hay más varietal Verdejo es Castilla-La Mancha, con alrededor de 5.500 hectáreas, lo que supone un 34,5% del total en España⁹. Hay, además, pequeñas cantidades plantadas en Extremadura, Aragón y Murcia entre otras Comunidades Autónomas ⁹.

1.1.3.5. Tempranillo.



Figura 12. Racimo de uva de la variedad Tempranillo.

La variedad Tempranillo produce una uva tinta con piel gruesa. Esta variedad crece mejor en altitudes relativamente elevadas, pero puede también tolerar climas mucho más templados, siendo poco resistente a la sequía extrema y a temperaturas elevadas. Produce racimos compactos con forma cilíndrica de bayas esféricas de color negro púrpura y con pulpa incolora (Figura 12). No está determinado el origen de la variedad en España, pero un estudio del Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino en colaboración con el Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario ha determinado que pudo surgir de una hibridación espontánea entre las variedades Albillo Mayor y Benedicto, en el último

milenio, probablemente en el entorno del valle del Ebro, considerándose por tanto autóctona de La Rioja^{12, 18}. Es llamada la "uva noble" de España, aunque se le conoce también con otros nombres locales como tempranillo riojano en La Rioja o cencibel en Castilla-La Mancha ^{2, 11, 15} . Es una variedad muy versátil que se cultiva también en Portugal, Francia, Argentina, México, Marruecos, Grecia, Sudáfrica y California. Produce un mosto con un pH mayor al de otros mostos, debido a la presencia de ácido málico, en lugar de ácido tartárico¹².

Según los últimos datos oficiales del Ministerio de Agricultura y la Subdirección General de Estadística, en España hay una superficie cultivada de viñedo de la variedad Tempranillo de 201.035 hectáreas, lo que supone un 11% de la superficie total de la vid del país ^{1, 9, 11} y un 17% de la superficie de cultivo en Castilla-La Mancha^{9, 11}. La variedad Tempranillo es la más utilizada en España para elaborar vinos tintos con crianza (autorizada en casi 30 Denominaciones de Origen españolas), tanto en sus versiones de monovarietal como en *coupage* con otras variedades tintas ^{1, 12, 16}.

1.1.4. El mosto de uva.

El Código Alimentario Español de 1967, define el mosto como «el zumo obtenido por presión de la uva en tanto no haya comenzado su fermentación, sin hollejo, pepitas ni escobajos»¹⁹. El mosto está compuesto principalmente por agua y una matriz de azúcares, que constituyen el componente mayoritario. Estos azúcares son glucosa y fructosa y constituyen entre un 80% y un 90% de los sólidos solubles del mosto. Por ello, son los que van a influir en el aporte calórico de esta bebida. Las proteínas están presentes a concentración de 0,2–0,3 g/L y no hay apenas lípidos.

En el momento de la maduración de la uva, los azúcares glucosa y fructosa están en una proporción ideal de 1:1 y a una concentración media de 190 g/L o 19°Brix. En cuanto al aporte calórico, que supone el consumo de mosto, varía en función de si es mosto blanco (entre 57,3 y 60,9 kcal/100 mL) o tinto (entre 58,7 y 62,4 kcal/100 mL)²⁰. En el mosto, además de azúcares y proteínas, hay vitaminas y minerales como el potasio (entre 20 y 40 mg/100mL) o el fósforo (alrededor de 15 mg/100mL) y microelementos como el hierro (0,3 mg/100mL). En conjunto, no son concentraciones elevadas, pero en pequeña medida, el consumo de mosto contribuye al aporte de micronutrientes a la dieta. Además, en el mosto hay otros compuestos que, por sus propiedades físico-químicas, son beneficiosos para la salud, y son los denominados compuestos bioactivos, entre los que destacan los polifenoles. Los polifenoles son una amplia familia de compuestos que se encuentran en concentraciones variables en el mosto y se caracterizan por tener capacidad antioxidante. Gracias a ello, la vid se protege de agresiones externas y condiciones climáticas adversas. Además, son responsables de los colores, olores y sabores propios y característicos de cada variedad de uva²¹.

La obtención del mosto es una de las primeras etapas para la elaboración del vino, gracias a la acción de las levaduras procedentes del hollejo de la uva, o gracias a levaduras comerciales adicionadas al mosto. La obtención de mosto para la producción de vino constituye la mayor demanda de este producto a nivel mundial. Sin embargo, el mosto de uva es una bebida natural cuyo consumo se ha extendido en gran medida en las últimas décadas, aunque ya se utilizaba desde la romanización de la Península Ibérica¹. El mosto se podría considerar una bebida energética por su composición en azúcares, vitaminas y minerales, lo que ha llevado a que este producto se utilice en la actualidad como base o complemento en la formulación de otros productos alimentarios.

1.1.4.1. Aplicaciones industriales del mosto de uva.

El mosto de uva tiene varias aplicaciones industriales, siendo la producción de vino la más destacada, ya que consume el 80% del volumen de uva cosechada^{10, 22}. La fermentación alcohólica de los azúcares de la uva por las levaduras producirá la aparición del vino, un producto complejo con multitud de productos metabólicos procedentes de todos los microorganismos implicados en el proceso, que son los responsables de sus característicos aromas, texturas y cuerpo, además de los efectos beneficiosos para la salud. En España, al igual que en el resto del mundo, la mayoría del mosto de uva que se genera es directamente fermentado para obtener vinos de diversa graduación, envejecimiento y sabor, principalmente en variedades tintas¹¹.

Otra aplicación importante del mosto de uva lo constituye el sector de la alimentación. El mosto se añade, junto a otras frutas o lácteos, como ingrediente principal en purés, papillas y zumos para alimentación infantil y deportiva. La finalidad es el aporte de azúcares y vitaminas de manera natural, sin alterar los sabores de la mezcla final. La presencia de los azúcares fructosa y glucosa, como componentes mayoritarios en los zumos, hace que no sea recomendable su consumo para los enfermos diabéticos. No obstante, es importante este aporte para niños y adultos con gran actividad física²⁰.

Una tercera aplicación del mosto en relación con la producción de bebidas alcohólicas es su uso para la chaptalización de los vinos. La chaptalización consiste en incrementar la concentración de azúcares en un mosto, usualmente de variedad tinta, utilizando azúcares naturales procedentes de mosto concentrado, principalmente de variedades blancas. Para ello, se suele añadir mosto blanco concentrado a 65°Brix. Este es un proceso especialmente recurrente en países con climas más fríos que los de las zonas mediterráneas, donde la uva no alcanza el grado de madurez necesario para producir vinos con la concentración alcohólica deseada. En España, la Ley 24/2003 del 10 de Julio de la Viña y del Vino, prohíbe el aumento artificial de la graduación alcohólica salvo en casos concretos expresamente autorizados debido a condiciones meteorológicas desfavorables. En el resto de los países de la Unión Europea, esta manipulación del mosto se autoriza en función de lo que tenga estipulado la reglamentación nacional. En Alemania y Francia se permite esta práctica mientras que, en Italia, al igual que en España, está prohibida. Este aspecto es uno de los principales puntos de la reforma agraria comunitaria en el sector vitivinícola, en debate desde 2007²³.

El proceso de concentración del mosto consiste básicamente, en una deshidratación parcial mediante evaporación, lo que provoca la eliminación de hasta un 60% de agua y concentra los azúcares hasta los 65°Brix²⁰. La empresa Mostos Españoles S. A., ubicada en Tomelloso (Ciudad Real), es una empresa pionera dedicada al procesamiento y concentración de mosto de uva, principalmente de la variedad Airén, en las diversas formas en las que lo comercializa (mosto concentrado normal, mosto concentrado decolorado y mosto concentrado aséptico). Sus productos están presentes en 30 países, siendo los principales destinos de exportación: Italia, Francia, Rusia, Holanda, Alemania, Portugal, Polonia, Ucrania, Grecia, Reino Unido y Finlandia. Mostos Españoles S.A. ha promovido y financiado esta investigación con el objetivo de caracterizar el contenido en polifenoles de los mostos concentrados que produce y de este modo poder tener una certificación propia de su calidad. Esto da un valor añadido al producto, puesto que los polifenoles son compuestos antioxidantes naturales, que se ha demostrado tienen importantes beneficios para la salud^{22, 24}.

1.2. Polifenoles.

Las plantas son organismos vivos complejos capaces, gracias a su metabolismo, de producir gran cantidad de compuestos químicos con una amplia variedad de funciones vitales^{21, 25}. Los productos metabólicos pueden agruparse en dos grandes grupos, el conjunto de metabolitos primarios y los metabolitos secundarios^{21, 26}. Los metabolitos primarios son aquellos compuestos implicados en rutas metabólicas de crecimiento directo de la planta, como pueden ser los azúcares producidos en las reacciones de fotosíntesis o las fitohormonas auxinas y giberelinas^{21, 27}. Los metabolitos secundarios son aquellos que participan en rutas metabólicas no relacionadas directamente con el crecimiento^{25, 26}. Hay metabolitos secundarios que ejercen de soporte mecánico como la lignina. Otros tienen la función de atraer animales polinizadores o dispersores del fruto, como las antocianidinas, que dan coloración a las flores^{27, 28}. Otros, como los polifenoles contribuyen a la resistencia de la planta frente a microorganismos e insectos y ayudan a preservar su integridad frente al estrés provocado por su continua exposición a factores ambientales, como pueden ser la radiación ultravioleta o las altas temperaturas entre otros²⁹⁻³¹. Los polifenoles están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, encontrándose en cantidades interesantes en el té^{32, 33}, hierbas silvestres^{34, 35}, cacao^{36, 37} o la uva^{22, 38}, así como en otros productos naturales como la miel, propóleos y jalea real^{27, 28, 39}.

1.2.1. Definición y síntesis de polifenoles.

Los polifenoles son un grupo heterogéneo de compuestos orgánicos, que poseen al menos un grupo fenol en su molécula^{25, 39, 40}, pudiendo tener en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por grupos hidroxílicos²⁸. Existen alrededor de 6.000 compuestos polifenólicos distintos en la naturaleza y se han clasificado de diferentes formas atendiendo a características estructurales o funcionales⁴¹⁻⁴⁴. Constituyen un grupo muy diverso desde el punto de vista de su estructura química, incluyendo desde moléculas sencillas con un único grupo fenol, como los ácidos fenólicos, hasta polímeros complejos, como los taninos o la lignina. Se sintetizan a partir de las rutas metabólicas de los poliacetatos y del ácido shikímico, siendo este último el responsable de la síntesis de la mayor parte de los polifenoles de las plantas.

A partir de la ruta de los poliacetatos se generan las quinonas, que participan en la formación del grupo de los flavonoides o el grupo fenoles simples y taninos²⁵. La ruta del ácido shikímico utiliza como precursores la eritrosa-4-P y el fosfoenolpiruvato (PEP) para sintetizar el ácido 3-deoxi-D-arabino-heptusolónico-7-fosfato (DAHP)^{25, 39}, que es el precursor del ácido shikímico y derivados de éste, como los aminoácidos aromáticos o el ácido cinámico, un ácido aromático que constituye una de las unidades básicas de muchos otros compuestos más funcionalizados (Figura 13) ^{25, 45-47}.

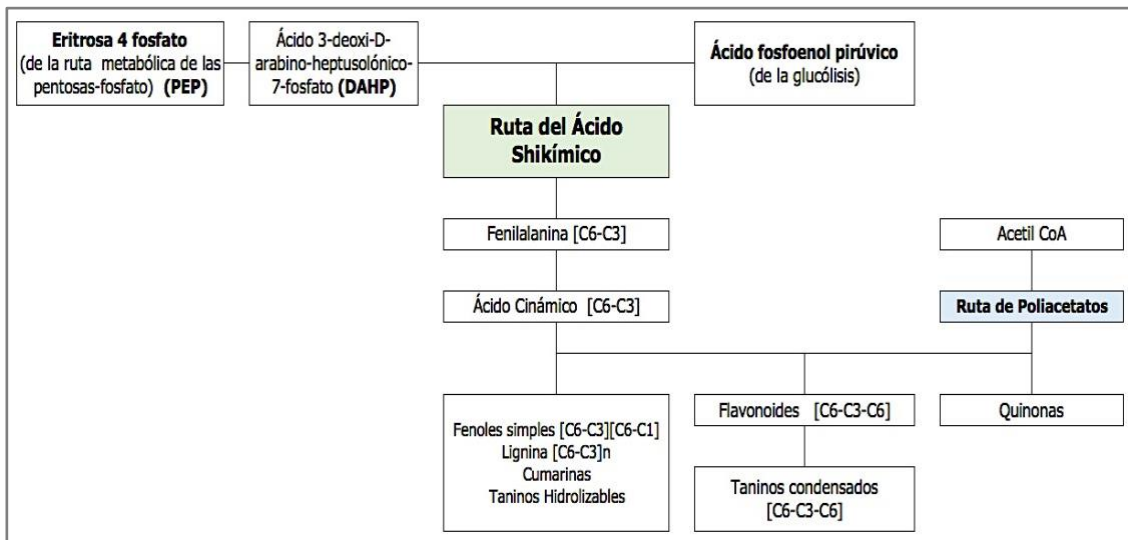


Figura 13. Rutas metabólicas de síntesis de polifenoles a partir del ácido shikímico y de la ruta de los poliacetatos²⁵.

Una de las rutas más importantes de síntesis de polifenoles es la ruta de los fenil-propanoides, en la que a partir de la fenilalanina se genera el ácido cinámico, del cual se pueden obtener el resto de fenil-propanoides: los estilbenoides, las isoflavonas y la naringenina, a partir de la cual se sintetizan otras familias polifenólicas como flavonoles, flavanoles o antocianidinas entre otros compuestos (Figura 14)^{25, 31, 39, 47}.

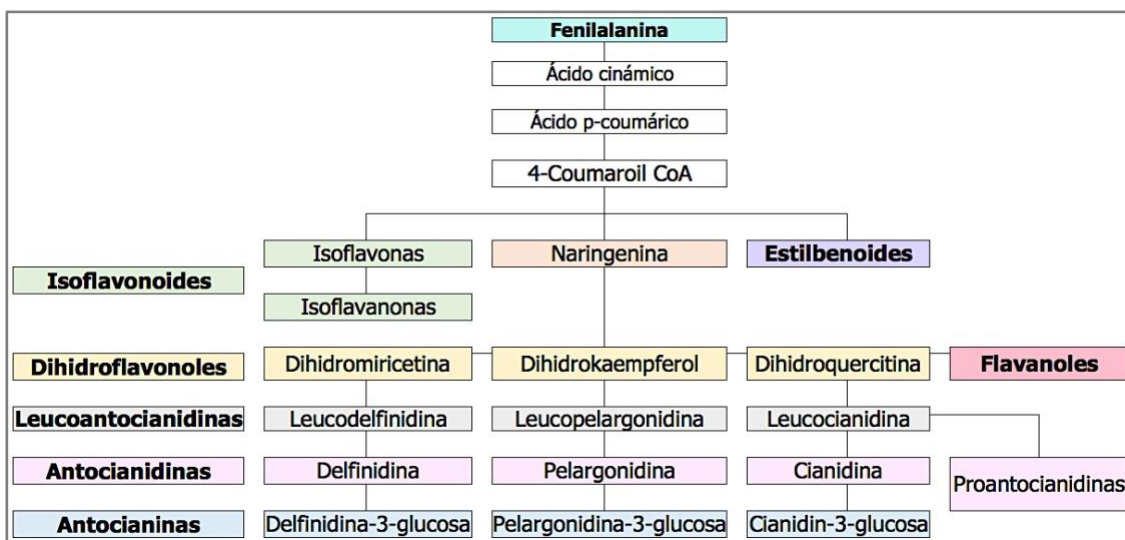


Figura 14. Ruta general de síntesis de los fenil-propanoides²⁴.

1.2.2. Estructura química y tipos de compuestos polifenólicos.

La clasificación más generalista, agrupa a la totalidad de los polifenoles procedentes de vegetales, sobre la base de su estructura química, en dos grandes grupos: los flavonoides y los no flavonoides. Los flavonoides se caracterizan por tener un esqueleto común compuesto de dos anillos de carbono de tipo difenil 1,3-propano (A y B) ligados a un anillo de pirano (C) y engloban a los flavonoles, flavonas, flavanonas, antocianinas, isoflavonas y flavanoles. El resto de familias polifenólicas tienen estructuras químicas más variadas y se engloban en el grupo de los no flavonoides, son los ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos), los lignanos, los estilbenos, y otros minoritarios (Figura 15)^{22, 25, 26, 28, 39, 48}.

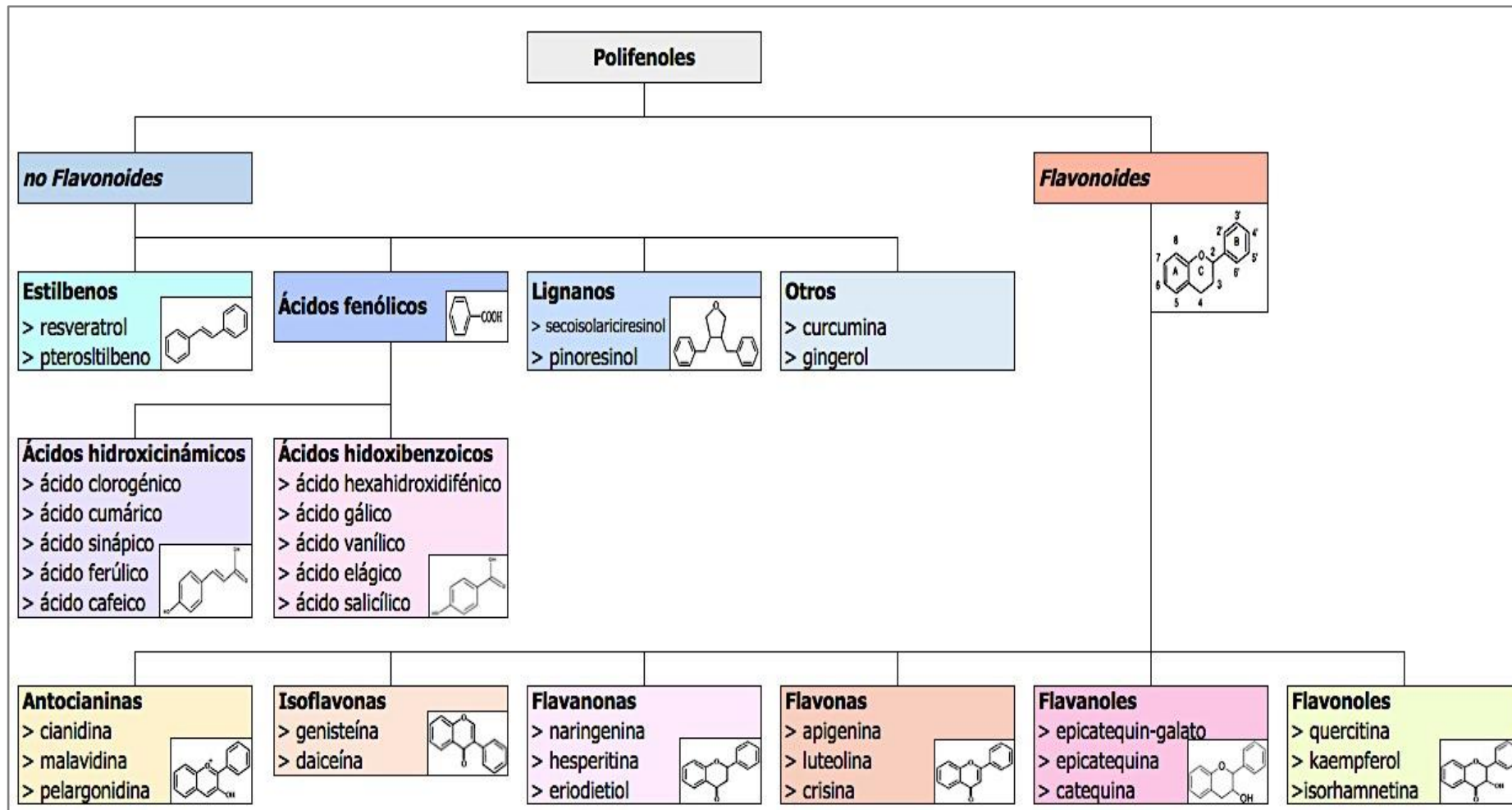


Figura 15. Clasificación general de polifenoles en base a su estructura química³⁹.

1.2.2.1. No Flavonoides.

- a) Ácidos fenólicos.** Son compuestos hidrosolubles y de pequeño tamaño, con una estructura química compuesta de un anillo fenólico y una función orgánica de ácido carboxílico. Es un grupo que, a su vez, se subdivide en dos grandes familias, que son los ácidos hidroxicinámicos y los ácidos hidroxibenzoicos^{25, 39, 49-51}.
- a. Los ácidos hidroxibenzoicos, también denominados hidroxibenzoatos, son compuestos sencillos que derivan del ácido benzoico y están formados por 7 átomos de carbono (C6-C1). El representante principal es el ácido gálico. Estos compuestos forman parte de estructuras complejas como los taninos hidrolizables, que son polímeros heterogéneos formados principalmente por unidades de ácido gálico o ácido hexahidroxidifénico, esterificados con azúcares, principalmente glucosa. Se encuentran en numerosas plantas y frutas, entre ellas la uva⁵²⁻⁵⁴.
- b. Los ácidos hidroxicinámicos, derivan del ácido cinámico y poseen 9 átomos de carbono (C6-C3). Destacan los ácidos cumárico, ferúlico y cafeico presentes en aceites, cereales y frutas respectivamente. Otros ácidos derivados de estos son el ácido clorogénico, que deriva de la unión del ácido cafeico y ácido quínico o la curcumina, derivada de la unión de dos moléculas de ácido ferúlico. Podemos encontrar estos ácidos en numerosas plantas, entre ellas, la vid^{55, 56}.
- b) Estilbenos.** Tienen una estructura química con 2 grupos fenoles unidos por un doble enlace de carbono (C6-C2-C6). Son moléculas que se ha descrito que tienen capacidad antimicrobiana y responden ante la generación de radicales libres de oxígeno por acción de la radiación ultravioleta. Son moléculas que, estructuralmente se pueden encontrar en forma *cis* o *trans*, y en la naturaleza están generalmente glicosilados^{50, 57, 58}. La molécula más representativa y más estudiada de esta familia es el resveratrol, que se ha probado tiene propiedades anticancerígenas, anti-inflamatorias, antioxidantes y cardioprotectoras⁵⁹⁻⁶¹. Los estilbenos se encuentran en las hojas, pecíolos y pieles de bayas y semillas; y el resveratrol en particular, se ha detectado en mayor cantidad en las hojas y la piel de los frutos ⁶².
- c) Lignanós.** Son polímeros derivados de la unión de moléculas de fenilpropano que están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Pueden encontrarse glicosilados con monómeros de azúcares. Una de las moléculas más

representativas de este grupo es el secoisolariciresinol, que se encuentran principalmente en las semillas vegetales^{63, 64}.

1.2.2.2. Flavonoides.

Los flavonoides, son el grupo polifenólico más ampliamente distribuido en las plantas. Como se ha mencionado anteriormente poseen un esqueleto común formado por dos anillos de carbono de tipo difenil 1,3-propano (A y B) ligados a un anillo de pirano (C), que es un heterociclo oxigenado (Figura 15) ^{39, 65, 66}. La mayoría de los flavonoides en la naturaleza están unidos a azúcares formando glucósidos y se han descrito numerosas propiedades asociadas a flavonoides concretos en relación con la defensa frente a agentes patógenos y su capacidad antioxidante⁶⁷. En base a los grupos funcionales que presentan, y el número y la posición de los hidroxilos, se subdividen en seis familias.

- a) **Flavonoles.** Constituyen el grupo más importante de flavonoides presentes en la uva. Son una familia de polifenoles que poseen un grupo alcohol y un grupo ceto en el heterociclo central³⁹. Se consideran compuestos bioactivos importantes por su capacidad fotoprotectora frente a la radiación ultravioleta y su capacidad antioxidante, que sirven para combatir el estrés ambiental. La concentración de estos compuestos en las plantas en general, y en la uva en particular, es dependiente de la variedad vegetal, de factores ambientales, tipo de cultivo o almacenamiento entre otras condiciones^{39, 65, 68}. La quercetina y el kaempferol son dos de los polifenoles más representativos de este grupo, están presentes en numerosas plantas y frutas y han demostrado tener propiedades anticancerígenas ^{69, 70}.
- b) **Flavanoles.** En esta familia están las catequinas y sus derivados glucosídicos⁷¹⁻⁷³. Químicamente, son moléculas que contienen diversos grados de hidroxilación en las posiciones 5 y 7 de ambos anillos y un grupo alcohol en el anillo central. Pueden formar compuestos poliméricos más complejos por condensación de monómeros, formando las denominadas proantocianidinas^{39, 74}. Están ampliamente presentes en numerosas bebidas, suplementos dietéticos o extractos de diversas plantas como el té o la uva, confiriendo propiedades antioxidantes y anticancerígenas, entre otros beneficios para la salud ⁷⁴⁻⁷⁷.
- c) **Antocianinas.** Son moléculas estructuralmente similares a los flavanoles, pero con el átomo de oxígeno cargado positivamente, haciendo que sean monómeros

reactivos. Constituyen los denominados taninos condensados, que son los responsables del color de los frutos y las flores en los vegetales^{39, 78, 79}.

- d) **Flavonas.** Son derivados de 2-fenil-4H-1-benzopir-4-ona. Las flavonas conservan el esqueleto de los flavonoides, pero tienen una ordenación de los átomos distinta. Poseen una cadena 3-C no saturada y un doble enlace entre C-2 y C-3, similar al de los flavonoles ³⁹. A diferencia de estos últimos, la flavona no posee hidroxilo en la posición 3 del heterociclo central⁸⁰⁻⁸². Se encuentran en las hojas de las plantas. Una de las flavonas más estudiada es la apigenina, que se ha demostrado que tiene efectos anticancerígenos^{80, 81}.
- e) **Isoflavonas.** Engloban compuestos derivados de 3-fenil-benzopiran-4-ona y son algo diferentes a otros tipos de flavonoides, ya que es en la posición del carbono 2 del heterociclo donde está ubicado el anillo fenólico, y no en la posición del carbono 1. Son los compuestos estructurales de las fitohormonas. Los más comunes son la genisteína o daidzeína. Se ha descrito que la soja tiene gran cantidad de estos compuestos ⁸³⁻⁸⁶.
- f) **Flavanonas.** Son moléculas que suelen encontrarse glicosiladas a partir de los átomos de C y O en la posición 7, para dar lugar a flavanonas glucosidadas. Estructuralmente son muy similares a las flavonas excepto en el doble enlace entre C-2 y C-3, del ciclo aromático central^{87, 88}. Los representantes de esta familia son la naringenina y la hesperetina. Están presentes en casi todos los tejidos de las plantas, y se hay un estudio que relaciona su inclusión en la dieta con una mejora en las capacidades cognitivas de personas adultas⁸⁹.

Además de estos dos grandes bloques de polifenoles, existe la familia de los neoflavonoides, que se diferencian de los flavonoides en su estructura molecular. Los flavonoides, como se ha mencionado anteriormente, poseen un esqueleto de 2-fenilcrome-4-ona; mientras que los neoflavonoides tienen un esqueleto de 4-fenilcromeno, sin sustitución de un grupo hidroxilo en la posición segunda. Estos compuestos se están estudiando como agentes quimiopreventivos frente al cáncer^{90, 91}.

1.2.3. Polifenoles de interés en la uva.

La vid es una planta rica en compuestos fitoquímicos producidos por su propio metabolismo, entre los que destacan los polifenoles. Estos compuestos están presentes en la uva y en sus productos derivados, como el mosto y el vino^{50, 75, 92}, si bien es cierto que la concentración de polifenoles en estos productos varía en función de la variedad de uva, la climatología, las prácticas de cultivo o el procesamiento de la uva para la obtención del mosto^{68, 93}.

Los principales compuestos polifenólicos presentes en la uva son los ácidos fenólicos, los estilbenos y las distintas familias de flavonoides^{22, 24, 94}. El tipo y la concentración de estos compuestos varía en función del tipo de uva y del tejido que analicemos, pero se ha comprobado que su concentración es mayor en la piel y en las semillas que en la pulpa de la uva^{22, 95}. Además, también hay diferencias en la concentración de polifenoles entre las variedades de uva blancas y tintas^{54, 93, 96}. Así, por ejemplo, se ha determinado que la concentración de flavanoles monoglicósidos monoméricos en extractos de semillas de la variedad Tempranillo (232µg/kg) es el doble que la cantidad detectada en la variedad Airén (112 µg/kg)⁹⁷. En un estudio comparativo de los flavonoides presentes en la piel y la semilla de uva Tempranillo, destacan en la piel de uva la catequina (69 mg/kg) o la procianidina B1 (79mg/kg), y en la semilla la catequina (51 mg/kg) y la epicatequina 40 (mg/kg)⁵⁵. Aunque no demasiados, también hay datos relativos al contenido de polifenoles en mosto de las variedades blancas de nuestro interés, como el caso de los estudios realizados en la variedad Gewürztraminer, donde destaca la alta concentración de catequina (8,8mg/L) y procianidinas (52mg/L), o en Sauvignon blanc, donde se detectaron elevadas concentraciones de catequina (4,7mg/kg) y epicatequina (1mg/kg) en la piel de la uva, pero no se pudieron cuantificar en la pulpa. Otros estudios recogen las diferencias polifenólicas en vinos de la variedad Verdejo y Airén, detectando ligeras variaciones entre la quercetina (4,05mg/L Verdejo y 1,98mg/L Airén) y el ácido gálico (2,46mg/L Verdejo y 1,49mg/L Airén) entre otros ⁹⁸⁻¹⁰⁰.

1.2.4. Polifenoles y salud humana

Los polifenoles, como se ha mencionado anteriormente, han demostrado ser potentes antioxidantes, una propiedad que les ha llevado a convertirse en un grupo importante de moléculas nutraceuticas^{75, 101, 102}. Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Un nutraceutico, es un producto natural que se presenta como una alternativa farmacéutica por tener beneficios fisiológicos. Se ha demostrado la actividad biológica de los polifenoles como antioxidantes celulares, la realizan interviniendo en las rutas metabólicas en respuesta a la oxidación, lo que reduce el riesgo de desarrollar ciertas enfermedades y ralentiza el envejecimiento celular^{101, 103, 104}. Esta característica ha llevado a realizar ensayos con polifenoles para analizar su efecto preventivo e incluso terapéutico en diferentes tipos de enfermedades humanas ^{50, 58, 105, 106}.

Se han realizado estudios para determinar el efecto de los polifenoles frente a enfermedades del sistema circulatorio, demostrándose que algunos de éstos compuestos reducen los niveles de biomarcadores de riesgo de enfermedades cardiovasculares mediante la inducción de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, la peroxidación lipídica, activación de la capacidad antioxidante plasmática total dislipidemia^{107, 108}. Existen estudios que indican que la ingesta de extractos de polifenoles de uva reduce los niveles de marcadores de riesgo cardiovascular y la presión arterial sistólica, por lo que ayudan a prevenir infartos y otras enfermedades cardiovasculares ^{59, 109, 110} El resveratrol es uno de los polifenoles más estudiados en este sentido y se ha demostrado que tiene efecto protector contra el daño cardiovascular, por su capacidad antiinflamatoria al evitar o revertir la acumulación de grasa y atenuar la hiperinsulinemia, protegiendo de este modo el corazón y la función endotelial^{111, 112}.

También se ha ensayado el efecto de los polifenoles en enfermedades del sistema nervioso, principalmente en Alzheimer y Parkinson¹¹³. Existen estudios que recogen cómo los polifenoles curcumina, catequina y epigallocatequina-3-galato tienen un efecto positivo en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer que se ha detectado por el descenso de la frecuencia de eventos adversos. Al parecer, estos compuestos actúan como neuroprotectores, previenen la agregación de cuerpos β -amiloides en las células cerebrales y protegen a las neuronas de compuestos tóxicos, lo que ejercería un efecto

anti-envejecimiento y de este modo retrasan la evolución de la enfermedad^{114, 115}. Estudios con quercetina a concentraciones comprendidas entre 10-100µM, han mostrado que tiene un efecto regulador en el mecanismo de sumoylación intracelular, un tipo de modificación post-traducciona que parece estar involucrada en los cambios fisiológicos de las neuronas relacionados con el Alzheimer¹¹⁶. También hay ensayos con polifenoles frente a otras enfermedades neurodegenerativas como la demencia senil¹¹⁷⁻¹²⁰ o neuroinflamaciones de microglía^{121, 122}, que han demostrado mejorías con el tratamiento. En el caso del resveratrol, se ha demostrado que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y reducir la neuroinflamación asociada a la enfermedad de Alzheimer¹²³ y otros procesos de neurodegeneración¹²⁴, algo muy interesante para poder continuar analizando su potencial terapéutico en este tipo de enfermedades. El mecanismo molecular que dirige estos efectos es desconocido por el momento, aunque está en estudio.

Además de lo ya expuesto, hay numerosos trabajos que analizan el efecto de polifenoles puros y de extractos vegetales ricos en polifenoles, en patologías muy diversas ¹²⁵. Por ejemplo, hay estudios con polifenoles de uva que les involucran en la prevención del desarrollo de cataratas o la degradación macular a través del mantenimiento de la presión intraocular, la regulación del metabolismo de la glucosa y la supresión de las citocinas proinflamatorias¹²⁶⁻¹²⁸. Otros estudios relacionan a los estilbenos resveratrol y pterostilbeno, con la prevención de enfermedades relacionadas con la edad y el envejecimiento, mediante la modulación del daño oxidativo, la inflamación, el desgaste de los telómeros o la senescencia celular ^{58, 129}.

Finalmente, hay que mencionar que los polifenoles no solamente se han estudiado desde el punto de vista terapéutico, sino también como elementos naturales que proporcionan beneficios para la salud. De hecho, se ha demostrado que estos compuestos tienen actividad probiótica, potenciando el crecimiento de la flora intestinal^{106, 130-132}. Se ha descrito que las proantocianidinas de uva tienen un efecto estimulante sobre las enzimas antioxidantes del intestino delgado, eliminando los radicales libres *in vivo* y de este modo previenen procesos oxidativos y de envejecimiento celular¹³³⁻¹³⁵. También se ha descrito que el ácido clorogénico muestra efectos positivos en el síndrome de desorden metabólico ¹³⁶.

1.2.4.1. Polifenoles y cáncer.

El cáncer es una enfermedad compleja que engloba más de 150 tipologías distintas¹³⁷. El cáncer sigue siendo una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, con aproximadamente 18 millones de casos activos en el mundo en 2018 y una estimación de hasta 29,5 millones de casos en 2040¹³⁸. Dos revoluciones importantes han cambiado los paradigmas del tratamiento del cáncer en los últimos años: una consiste en atacar las alteraciones genómicas en los cánceres impulsados por oncogenes y la segunda que viene de la mano de la inmuno-oncología. No obstante, aún existen desafíos importantes en el campo de la terapia contra el cáncer y uno de estos desafíos es encontrar compuestos naturales que puedan servir para prevenir o para usarse como adyuvantes en terapias anticancerígenas y aquí unos de los compuestos que están en primera línea son los polifenoles por su actividad antioxidante¹³⁹.

Existen numerosos estudios con polifenoles y cáncer que han permitido determinar los mecanismos moleculares que permiten a estos compuestos interferir en estas patologías. Se ha demostrado que los polifenoles ejercen un efecto directo en la modulación de las vías de señalización y la expresión de genes específicos que promueven una reducción en la tasa de crecimiento de las células cancerosas^{60, 61, 139}. Además, hay datos que demuestran que los polifenoles pueden ayudar a revertir la progresión de las células tumorales o a paliar los efectos secundarios de algunas terapias anticancerígenas^{53, 69}.

Estudios realizados con extractos de polifenoles de uva y otros frutos y semillas han demostrado su capacidad para inhibir el crecimiento de células tumorales de próstata (un 5%)¹⁴⁰ y de colon (hasta un 50%)¹⁴¹. También existen numerosos estudios realizados con polifenoles individuales como el resveratrol, que es uno de los polifenoles más estudiados, que han demostrado que este compuesto puede actuar como agonista o antagonista para el receptor de estrógenos, lo que lo convierte en una molécula interesante como coadyuvante en el tratamiento de los cánceres dependientes de hormonas como el cáncer de mama¹⁴². Estudios con otros polifenoles como el pterostilbeno, ácido gálico, kaempferol o ácido elágico, han demostrado que inducen apoptosis en células tumorales de cáncer de hígado (Hep-G2), de mama (MCF-7) o de vejiga (TSGH-8301), a través del arresto del ciclo celular en fase Go/G₁¹⁴³⁻¹⁴⁸.

1.2.4.2. Polifenoles y leucemia.

La leucemia, es un término que se utiliza para englobar al conjunto de enfermedades malignas de la médula ósea, por las cuales se desarrolla el cáncer hematológico que provoca un aumento de leucocitos de manera descontrolada. Es un tipo de cáncer que afecta a la sangre, a la médula ósea y al sistema linfoide, así como a la diferenciación de las células hematopoyéticas normales¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Algunos tipos de leucemia pueden afectar, además, a distintos precursores de líneas celulares de la médula ósea como los precursores de líneas mieloides, monocíticas, megacariocíticas o eritroides. Las células cancerígenas impiden la producción de glóbulos rojos, plaquetas y los propios leucocitos de forma sana. Se presentan los síntomas cuando hay un descenso de células sanguíneas y las células cancerosas se propagan por el sistema circulatorio a través del torrente sanguíneo o del sistema linfático. La capacidad invasiva incluye tanto al cerebro y la médula espinal como al resto de los órganos, pudiendo afectar al sistema nervioso periférico ¹⁵²⁻¹⁵⁴.

Según la transformación del linaje celular (mieloide o linfoide) y las características clínicas (agudas o de crecimiento rápido y crónicas, de crecimiento más lento), se han definido cuatro tipos principales de leucemia:

- **Leucemia mieloide aguda (LMA):** es una enfermedad neoplásica que implica una proliferación anormal de leucocitos indiferenciados en medula ósea con infiltración a sangre y otros tejidos. Este tipo de leucemia incluye una gran variedad de cánceres y es la leucemia aguda más frecuente en personas de edad avanzada ^{150, 151}.
- **Leucemia mieloide crónica (LMC):** es una neoplasia mieloproliferativa crónica que afecta a las células madre hematopoyéticas. Se caracteriza por una proliferación de los glóbulos blancos de la serie granulocítica, esplenomegalia, trombocitosis y anemia. Se origina por una mutación genética, una translocación entre los cromosomas 9 y 22. Este tipo de leucemia representa casi el 15% de los casos totales de leucemia, siendo más habitual en varones adultos que en mujeres y tiene escasa incidencia en niños ^{151, 155}.
- **Leucemia linfoblástica aguda (LLA):** se caracteriza por un incremento de células linfoides inmaduras y no funcionales que se originan a partir de células

progenitoras hematopoyéticas en la médula ósea o el sistema linfático. Esto provoca anemia, granulocitopenia y trombocitopenia, que generan en el individuo fatiga, debilidad, procesos infecciosos y hemorragia. Es el tipo de neoplasia más común en niños (representa el 78% de los casos de leucemia pediátrica frente al 9% de incidencia en adultos), siendo también frecuente en personas en edad avanzada (más de 65 años)^{150, 151}.

- **Leucemia linfocítica crónica (CLL):** es la leucemia más común en personas de la tercera edad y ancianos. Se genera por una proliferación monoclonal de linfocitos B maduros y se define por el número absoluto de células neoplásicas en la sangre. Las células cancerosas se originan en la médula ósea, pero luego llegan hasta la sangre^{150, 151}.

En países desarrollados, durante los últimos cincuenta años, esta enfermedad ha pasado de ser mortal a convertirse en una enfermedad con una tasa de supervivencia a 5 años superior al 90% entre los niños y adultos que reciben tratamiento dirigido¹⁵⁶. En España, en el año 2020 fueron diagnosticados 6242 casos de leucemia, con una mortalidad del 3,2%. La ratio de incidencia anual de leucemia en el mundo es de 5 casos cada 100.000 personas en el año 2020 ¹³⁸.

Hay numerosos estudios realizados con células crecidas *in vitro* que muestran que los polifenoles tienen un efecto antiproliferativo sobre las células de leucemia ¹⁵⁷⁻¹⁶⁰, siendo el resveratrol y los flavonoides, las moléculas que más se han utilizado ¹⁶¹⁻¹⁶⁵. Los estudios realizados con diferentes compuestos y líneas celulares indican que la parada de la división celular y la inducción de la apoptosis son los mecanismos más comúnmente activados por acción de los polifenoles, dándose en ocasiones la activación de ambas rutas de manera complementaria. Así, por ejemplo, se ha demostrado que el resveratrol y la quercetina inducen apoptosis en líneas de leucemia linfocítica mediante la activación de caspasas¹⁶⁶⁻¹⁶⁹. Otros estudios han mostrado, que las catequinas y sus derivados inducen apoptosis en células de leucemia mielocítica y promielocítica ^{170, 171}. También hay varios estudios que muestran que el resveratrol y otros estilbenos como la polidatina o el pterostilbeno, inducen la parada de la división celular en líneas de leucemia mieloide y linfocíticas crecidas *in vitro* ^{169, 172-174}. Algo similar se ha visto en líneas tumorales de células mieloides tempranas por efecto del ácido gálico, quercetina, catequina o epicatequina ^{170, 175, 176}.

Aunque no hay muchos estudios *in vivo*, un ensayo clínico realizado con epigallocatequina-galato en pacientes con leucemia linfocítica crónica indica que este compuesto puede ayudar a tratar la enfermedad, puesto que se ha visto una reducción de un 50% en el tamaño de los ganglios linfáticos¹⁷⁷. Estudios más recientes desarrollados *in vitro*, apoyan que el tratamiento combinado con diferentes polifenoles y otros productos terapéuticos puede servir para modular múltiples vías de transducción de señales implicadas en el cáncer. Los resultados obtenidos muestran un mayor efecto en la inhibición del crecimiento en líneas mieloides o linfoides cuando se suministran de modo conjunto varios polifenoles como quercetina, ácido elágico, resveratrol o pterostilbeno, o mezclas de estos con agentes quimioterapéuticos, lo que apunta a un efecto sinérgico entre ellos¹⁷⁸⁻¹⁸¹.

La mayoría de los datos experimentales obtenidos con líneas celulares de leucemia de diferente linaje y con polifenoles de diferente familia y origen vegetal, apuntan a un efecto positivo de estos compuestos en la inhibición del crecimiento de las células tumorales. Por ello, dado que nuestro objeto de estudio es el mosto de uva, un producto natural que contiene polifenoles y es de gran aplicación en industria alimentaria, nos planteamos hacer una revisión sistemática, con el fin de determinar si hay datos experimentales suficientes que respalden globalmente el efecto positivo de los polifenoles de uva en el tratamiento y/o prevención de la leucemia.

1.3. Revisión sistemática y meta-análisis.

Una revisión sistemática, es una recopilación bibliográfica de toda la investigación e información relevante acerca de una temática concreta, para realizar una síntesis de conocimiento. El objetivo es reunir toda la evidencia empírica que cumple unos criterios de elegibilidad previamente establecidos, con el propósito de responder una pregunta específica de investigación. La finalidad es alcanzar conclusiones que ayuden a realizar elecciones acertadas, sobre todo aplicado al ámbito clínico. Para ello, se utilizan métodos sistemáticos y explícitos, que se aplican con el fin de minimizar sesgos y obtener resultados fiables que permitan extraer conclusiones que ayuden a tomar decisiones^{182, 183}. La revisión sistemática suele ser complementada con el meta-análisis, que es un análisis estadístico de los datos incluidos en el estudio, ya sean procedentes de ensayos clínicos, investigaciones terapéuticas o resultados experimentales. Este estudio permite analizar discrepancias, cuantificar la relevancia de los resultados y determinar el grado

de fiabilidad de las conclusiones, algo especialmente deseable cuando el fin es adecuar o mejorar tratamientos para tratar o prevenir enfermedades.

También se pueden meta-analizar datos extraídos de publicaciones científicas en el caso de estudios que no sean estrictamente clínicos. Estos datos son igualmente tratados de manera sistemática, siguiendo los protocolos recogidos en el manual PRISMA Statement¹⁸⁴⁻¹⁸⁶, que han sido desarrollados por la Colaboración Cochrane. Cochrane es una organización, sin ánimo de lucro que reúne a más de 11.500 investigadores de ciencias de la salud distribuidos en 90 países. Trabajan aplicando este riguroso proceso para realizar revisiones sistemáticas de las intervenciones en salud. Todos los resultados que se obtienen son publicados en la Biblioteca Cochrane, la cual es accesible online y es actualizada cada tres meses¹⁸⁷.

A partir de todo lo expuesto anteriormente, sobre las propiedades beneficiosas de los polifenoles en el tratamiento de diferentes patologías, incluido el cáncer; y teniendo en cuenta el objetivo del trabajo, que es caracterizar los polifenoles del mosto de uva Airén, en este trabajo también se ha incluido una revisión sistemática y meta-análisis sobre el efecto de los polifenoles de uva en leucemia. La elección de esta enfermedad vino determinada por la alta incidencia de la leucemia linfoblástica aguda en niños y el hecho de que el mosto de uva es un componente esencial en la formulación de muchos productos alimentarios de alto consumo en niños y jóvenes deportistas (papillas, zumos, compotas, etc)¹⁸⁸.



2. Objeto y alcance de la tesis.

2.1. Objetivo general.

El objetivo de este trabajo de investigación es caracterizar el contenido en polifenoles del mosto de uva de la variedad Airén, analizar su estabilidad durante el proceso de concentración del mosto y su efecto sobre las células de leucemia humanas.

2.2. Objetivos específicos.

Los objetivos concretos que se persiguen son los siguientes:

1. Identificar y cuantificar los polifenoles del mosto de uva de la variedad Airén mediante la técnica de HPLC-MS.
2. Comparar el contenido polifenólico en mostos de las variedades de uva más cultivadas en Castilla-La Mancha.
3. Determinar si el proceso de obtención de mosto de uva concentrado afecta cuantitativa o cualitativamente a los polifenoles.
4. Evaluar el efecto de los polifenoles de uva en la proliferación de células tumorales de leucemia humanas cultivadas *in vitro*.



3. Materiales y Métodos.

3.1. Materiales.

3.1.1. Muestras de mosto.

Se han analizado muestras de mosto fresco de cinco varietales de uva: cuatro de uva blanca (Airén, Gewüztraminer, Sauvignon Blanc y Verdejo); y una variedad de uva tinta (Tempranillo); todas ellas cultivadas en la provincia de Ciudad Real entre los años 2017 y 2018. Estas muestras de mosto fresco se han obtenido de la bodega Vinícola de Tomelloso.

También se han estudiado muestras de mosto de la variedad Airén, recogidas en tres etapas diferentes del proceso de concentración, que realiza la empresa Mostos Españoles S.A. para la obtención de mosto concentrado. Se han analizado tres muestras del proceso de obtención de mosto concentrado normal: una inicial a 19°Brix (MCNi), intermedio a 30°Brix (MCNm) y final a 65°Brix (MCNf). Del mismo modo se han analizado tres muestras de del proceso de obtención de mosto concentrado decolorado: inicial a 19°Brix (MCDi), intermedio a 30°Brix (MCDm) y final a 65°Brix (MCDf). Las medidas del grado Brix se han realizado con el Refractómetro digital Atago RX-5000. Todas las muestras de mosto recogidas se mantuvieron congeladas a -20°C hasta su análisis en el laboratorio.

3.1.2. Reactivos y compuestos polifenólicos.

Los reactivos químicos utilizados para la extracción de polifenoles de las muestras de mosto, el estudio de su capacidad antioxidante y su posterior análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas (MS) se recogen en la tabla 1, donde se indica el grado de pureza, número de referencia y la casa comercial.

Tabla 1. Reactivos químicos y solventes.

Nombre	Calidad [≥]	Nº CAS / Nº CE / CAT	Distribuidor
2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	95,00%	1898-66-4	Alfa Aesar
Acetona	99,99%	67-64-1	Panreac Applichem
Acetonitrilo	99,90%	75-05-8	Panreac Applichem
Ácido fórmico	98,00%	64-18-6	Panreac Applichem
Ácido fosfórico	85-88%	7664-38-2	Panreac Applichem
Ácido clorhídrico	36,5-38%	7647-01-0	Panreac Applichem
Etanol absoluto	99,99%	64-17-5	Panreac Applichem
Metanol	99,90%	67-56-1	Panreac Applichem

Todas las disoluciones y tampones utilizados en la extracción y análisis de polifenoles mediante HPLC-MS se hicieron con agua miliQ (18,2MΩ.cm, 2ppb) purificada con el equipo IQ7003 Millipore.

Para la identificación y cuantificación de los polifenoles mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas (MS) se utilizaron como patrones los polifenoles comerciales que se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Compuestos polifenólicos comerciales utilizados.

Nombre	Calidad [≥]	Nº CAS / Nº CE / CAT	Distribuidor
Ácido 4-aminobenzoico	99,00%	150-13-0	Sigma-Aldrich
Ácido acetilsalicílico	99,00%	50-78-2	Sigma-Aldrich
Ácido cafeico	98,00%	331-39-5	Sigma-Aldrich
Ácido clorogénico	95,00%	327-97-9	Sigma-Aldrich
Ácido elágico	95,00%	476-66-4	Sigma-Aldrich
Ácido gálico	99,00%	5995-86-8	Sigma-Aldrich
Ácido p-cumárico	98,00%	501-98-4	Sigma-Aldrich
Ácido protocatecuico	99,40%	99-50-3	HWIgroup
Ácido salicílico	99,00%	69-72-7	Sigma-Aldrich
Ácido trans-ferúlico	99,00%	537-98-4	Sigma-Aldrich
Ácido vanílico	97,00%	121-34-6	Sigma-Aldrich
Apigenina	99,00%	520-36-5	Sigma-Aldrich
Epicatequina	90,00%	490-46-0	Sigma-Aldrich
Esculetina	97,50%	306-01-1	Sigma-Aldrich
Hidrato de catequina	96,00%	225937-10-0	Sigma-Aldrich
Isorhamnetina	95,00%	480-19-3	Sigma-Aldrich
Kaempferol	90,00%	520-18-3	Sigma-Aldrich
Luteolina	98,00%	491-70-3	Sigma-Aldrich
Polidatina	95,00%	65914-17-2	Sigma-Aldrich
Quercetina	95,00%	117-39-5	Sigma-Aldrich
Resveratrol	99,00%	501-36-0	Sigma-Aldrich
Rutina	99,00%	153-18-4	PhytoLab
Siringaldehido	98,00%	134-96-3	Sigma-Aldrich
Viniferina	99,00%	62218-13-7	Sigma-Aldrich

3.1.3. Análisis estadístico.

Para comparar la concentración de polifenoles en los mostos de los distintos varietales y del mosto concentrado Airén, se ha realizado un análisis estadístico de los resultados utilizando los programas SPSS¹⁸⁹ y R-Commander¹⁹⁰.

Se han analizado los datos procedentes de cuatro muestras biológicas analizadas por triplicado. Se hizo un análisis de los estadísticos descriptivos principales: media, mediana, moda, desviación estándar, cuartiles y percentiles. Para elegir el test de comparación de medias más adecuado, se comprobó la normalidad en la distribución de los datos mediante el test de Shapiro–Wilks. Una vez comprobada la normalidad en la distribución, se realizó el test de Barlett para medir la homocedasticidad de los datos. La comparación de las concentraciones de polifenoles en las muestras de mosto de diferentes varietales, se ha realizado mediante un análisis de varianza (ANOVA, del inglés: *Analysis of Variance*) y la prueba post hoc de Tukey, realizando comparaciones 2 a 2, incluyendo la corrección de Welch.

Para determinar la estabilidad en la composición de los polifenoles estudiados en el mosto de la variedad Airén durante el proceso industrial de concentración, se realizó un análisis t-Student (paramétrico) de muestras dependientes (centrando el estudio en la variación inicial-final), referido a la concentración de cada polifenol. El nivel de significación para todos los análisis estadísticos fue de 0,01% ($p\ value < 0,01$).

Para analizar la relevancia real de los resultados que los test utilizados indican como diferencias estadísticamente significativas, se ha usado el criterio de “*fold of change*”, utilizado asiduamente en los estudios de metabolómica, para evaluar la calidad de los resultados obtenidos¹⁹¹. El valor de “*fold of change*” se calcula haciendo el cociente entre la concentración determinada para cada polifenol en los mostos de los diferentes varietales dividida por la concentración del polifenol en el mosto Airén. En base a esto, se ha creado una tabla de valoración de la relevancia (Tabla 3) y se ha adoptado el criterio de que un valor de *fold of change* superior a 1,15 y $p < 0,01$, indica un cambio relevante en la concentración del polifenol entre las muestras analizadas¹⁹¹.

Para la evaluación de la relevancia siguiendo este criterio es necesario que las diferencias de concentraciones de los polifenoles sean estadísticamente significativa,

referido al análisis de varianza ANOVA. Se ha incluido el valor 0 para asignarlo a los datos que no muestran diferencias estadísticamente significativas. Para el resto, se han establecido cuatro niveles: el nivel 1 refleja las variaciones inferiores al 15%, que poseen una relevancia insuficiente; el nivel 2 indica variaciones de concentración entre un 15 y 30%; el nivel 3 comienza cuando la diferencia es del doble del criterio mínimo, es decir, del 60%; y el nivel 4 indica diferencias de concentración que superan el 60%, tanto por exceso como por defecto.

Tabla 3. Criterios de relevancia adoptados basados en el valor de "fold of change".

Valor (diferencia)	Evaluación cualitativa	<i>Fold of change</i>
0 – (nula)	No significativa	0
1 – (insuficiente)	Significativa pero inferior al 15%	[0.85 – 1] ó [1 - 1.15]
2 – (baja)	Significativa entre 15% - 30%	[0.7 - 0.85] ó [1.15 - 1.3]
3 – (media)	Significativa entre 30% - 60%	[0.4 - 0.7] ó [1.3 - 1.6]
4 – (alta)	Significativa por encima del 60%	<0.4 ó >1.6

3.2. Métodos.

3.2.1. Método de concentración del mosto de uva.

El proceso de concentración del mosto de uva, que se realiza en la empresa Mostos Españoles S.A., es un proceso mecanizado desde la recepción del mosto fresco hasta su envío al cliente. El mosto fresco procedente de las cooperativas es analizado para determinar una serie de parámetros de calidad según normativa recogida en el R.D 1044/1987. Para ello, se utiliza el analizador químico de alto rendimiento Miura 200, de Tecnología Difusión Ibérica, que informa de la concentración de azúcar, el pH, la cantidad de distintos metales como el hierro, magnesio o manganeso y el contenido de ácidos sencillos como el ácido tartárico, entre otros parámetros. El mosto fresco que llega a la fábrica tiene 19º Brix, con ligeras variaciones en función del varietal e inmediatamente se le añade anhídrido sulfuroso (SO₂) a 880 ppm para evitar la fermentación alcohólica por acción de las levaduras presentes. El mosto tratado, se almacena en grandes tanques de acero inoxidable a temperatura no controlada, hasta que se inicia el proceso de concentración. El tiempo medio de permanencia del mosto en estos tanques es de 90 días.

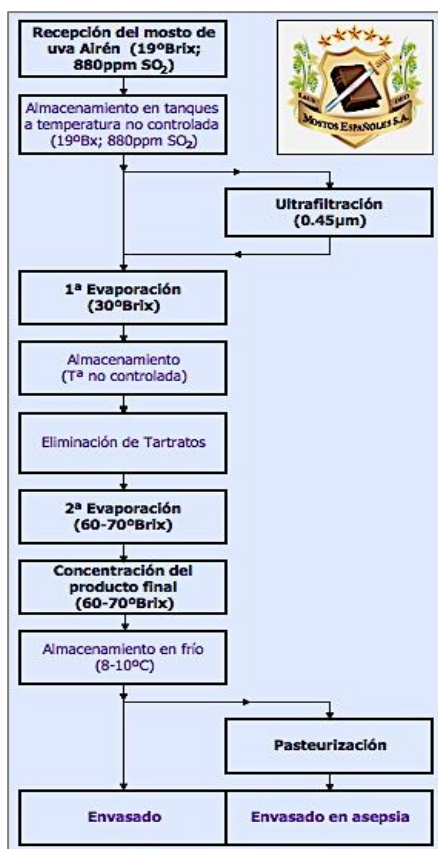


Figura 16. Esquema del proceso de concentración del mosto llevado a cabo en Mostos Españoles S.A.

El proceso de concentración del mosto llevado a cabo en la fábrica de Mostos Españoles S.A. es básicamente el descrito por Carreño *et al.*²⁰, que se muestra esquematizado en la figura 16. El mosto se somete a un proceso de calentamiento a una temperatura de 95ºC, para eliminar agua por evaporación y de este modo concentrar los azúcares, desde 19 a 65º Brix. El proceso tiene lugar en el tanque concentrador en dos fases, en la primera se concentra el mosto hasta los 30º Brix, después se enfría de manera controlada hasta los 60-70ºC, y a continuación se vuelve a calentar hasta alcanzar los 65º Brix. El mosto concentrado final, se almacena en tanques de acero inoxidable refrigerados a 8-10ºC hasta su envasado directo. En ocasiones, el mosto se somete a un proceso de pasteurización y posterior envasado en condiciones asépticas.

La fábrica produce mosto concentrado normal (MCN) y mosto concentrado decolorado (MCD). Para la obtención del mosto decolorado se necesita un paso de clarificación previo a la concentración, que consiste en la filtración del mosto a través de membranas tubulares de nitrocelulosa de 0,45µm de diámetro de poro, utilizando el equipo de ultrafiltración Permawine (Permeare). Este proceso permite eliminar del mosto los compuestos responsables del color como metales, flavonoides y antocianos, obteniendo así un mosto incoloro. El proceso de concentración, almacenamiento y envasado es el mismo que el descrito anteriormente para el mosto normal.

3.2.2. Extracción de polifenoles.

Se han descrito numerosos métodos de extracción de polifenoles de plantas que varían dependiendo del tejido vegetal de partida. En el caso de la vid, se han extraído polifenoles de las hojas, de las partes leñosas de la planta, así como de las diferentes partes que componen la baya, como son la pulpa y las semillas^{42, 192, 193}. Los materiales de partida sólidos, como las semillas^{75, 194} y los orujos, son los tejidos en los que se ha descrito una mayor abundancia de polifenoles. A partir de la piel de uva^{192, 195-197} también se realizan extracciones de fracciones polifenólicas.

La mayor parte de los polifenoles de la uva pertenecen a las familias de los estilbenos^{198, 199}, ácidos fenólicos^{192, 200}, flavonoides^{68, 96} y proantocianidinas⁷⁶. Los solventes más utilizados para la extracción de polifenoles de muestras vegetales son los alcoholes etanol y metanol, por ser solventes orgánicos y polares. Para realizar la extracción de polifenoles de las muestras de mosto de uva analizadas en este trabajo se han probado diversos métodos que se exponen a continuación.

3.2.2.1. Extracción directa con solventes.

En base a la bibliografía existente, para la obtención de extractos ricos en polifenoles a partir de muestras de uva, vino y otros derivados y desechos de la vid^{104, 201, 202}, se han realizado ensayos con diferentes solventes modificando todas las variables posibles con el fin de determinar las mejores condiciones de extracción de los polifenoles del mosto de uva. Este procedimiento consiste en mezclar un volumen de mosto con un volumen de solvente, incubarlo un tiempo determinado en unas condiciones de temperatura fijas y a continuación, se centrifuga la mezcla con el objetivo de sedimentar la mayor parte de los azúcares y otros componentes insolubles del mosto, dejando en solución los

polifenoles. Las variables analizadas han sido:

1. El tipo de solvente. Se han utilizado metanol, etanol y acetona.
2. Las proporciones en volumen de mosto y de solvente, desde (1:1) a (1:10).
3. El tiempo de extracción: 15, 30, 60, 120, 150 y 180 minutos.
4. El pH de los solventes, ajustando a valores de 2,25, 7 y 9,25. El ajuste del pH se hizo con hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido fosfórico y ácido fórmico.
5. La temperatura de extracción: 4°C y temperatura ambiente.

Finalmente, las extracciones se realizaron añadiendo metanol al mosto en una proporción 5:1 (v/v), incubando la mezcla a 4°C durante 120 minutos con agitación y a continuación se centrifugaron 15 minutos a 13.000rpm y 4°C, en una centrífuga de mesa (Heraeus FRESCO 17, Thermo Scientific), para sedimentar los compuestos no solubles, azúcares en su mayoría. El sobrenadante obtenido se filtró a través de un filtro de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,45µm y se almacenó a -80°C en viales de vidrio (1.5mL, 32x11.5mm) sellados con un tapón de rosca de 8mm con un Septum Butilo/PTFE hasta su análisis posterior mediante HPLC y HPLC-MS.

3.2.2.2. Extracción a partir de mosto solidificado con arena de sílice.

Este procedimiento consiste en solidificar la muestra de mosto utilizando arena de sílice, para realizar a continuación una extracción sólido-líquido, similar a los procedimientos descritos para la extracción de polifenoles de los componentes sólidos de la uva, como los raspones, el hollejo o las semillas^{S203, 204}. Para ello, se añaden 2 gramos de arena de sílice por mililitro de mosto, se homogeniza y la mezcla se congela a -80°C durante 30 minutos. Después se realiza una deshidratación a vacío a 30°C en Speedvac (Thermo Fisher Scientific). La extracción de polifenoles se hace añadiendo 5mL de metanol por gramo de muestra deshidratada, la mezcla se incuba durante 2 horas a 4°C con agitación suave en un agitador rotatorio. A continuación, la mezcla se centrifuga durante 15 minutos a 13.000 rpm y 4°C en una centrífuga de mesa y se recupera el sobrenadante que se filtra y almacena como se ha descrito en el apartado anterior hasta su análisis.

3.2.2.3. Extracción a partir de muestras de mosto liofilizado.

Este método se basa en una extracción con solventes a partir de una matriz de mosto liofilizado. Para ello, se tomaron muestras de mosto de 200µL, se congelaron a -80°C y se liofilizaron utilizando el equipo CRYODOS de Telstar. Tras la liofilización, las muestras se conservaron a 4°C herméticamente cerradas hasta su utilización. La extracción de polifenoles se hizo añadiendo 1mL de metanol a la muestra liofilizada, que se incubó durante 2 horas a 4°C con agitación rotatoria. A continuación, se centrifugó la mezcla durante 15 minutos a 13.000rpm y 4°C, en una centrífuga de mesa (Heraeus Fresco17). El sobrenadante se filtró y se almacenó hasta su análisis, como se ha descrito en el apartado 3.2.2.1.

3.2.3. Cuantificación de polifenoles mediante espectrofotometría.

La estimación del contenido total de polifenoles se realizó mediante espectrofotometría. Esta técnica permite determinar los polifenoles presentes en base a las estructuras químicas que presentan estos compuestos y la absorción de luz de longitud de onda específica. Para ello, se utilizó el equipo SmartSpec Plus Spectofotometer de BioRad, que permite el análisis de la absorbancia en un rango UV-Visible (200nm-800nm). Las medidas espectrofotométricas de absorbancia se hicieron a 280nm utilizando cubetas trUVView Cuvette de 50µL de volumen. Usualmente, la concentración total de polifenoles se normaliza utilizando como referencia el ácido gálico y se expresa en mg/L equivalentes de ácido gálico (GAE)^{205, 206}.

3.2.4. Determinación de la capacidad antioxidante con DPPH.

Para valorar la capacidad antioxidante de los extractos de polifenoles del mosto de uva, se ha utilizado el método descrito por Brand-Williams ²⁰⁷, utilizando el reactivo di(fenil)-(2,4,6-trinitrofenil)iminoazanio (DPPH). Éste es un método indirecto, que se basa en la cesión de un hidrógeno de un compuesto antioxidante al DPPH, que es un radical libre conocido. El radical DPPH tiene un color violeta intenso en solución y se vuelve incoloro o amarillo pálido cuando se neutraliza. Gracias a esta propiedad óptica se puede monitorizar la velocidad de reacción realizando medidas de absorbancia a una longitud de onda de 562nm²⁰⁷⁻²⁰⁹.

Los ensayos se hicieron en placas de 96 pocillos (Nunc Delta Surface), utilizando 200 μ L de DPPH 60 μ M disuelto en metanol y volúmenes variables de los extractos de los mostos (0-20 μ L). El tiempo de reacción fue de 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y transcurrido este tiempo se analizó la neutralización del DPPH midiendo absorbancia a 562nm en un espectrofotómetro TECAN, modelo Sunrise. Se realizaron curvas de calibrado con ácido gálico con el fin de poder expresar los resultados en equivalentes de este polifenol. La capacidad antioxidante se indica como la concentración de extracto o de polifenol necesaria para neutralizar el 50% del DPPH añadido en la reacción (IC₅₀).

3.2.5. Análisis de los extractos de polifenoles de mosto mediante HPLC.

Para determinar la composición en polifenoles de los extractos del mosto, se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En todos los casos se utilizó una columna cromatográfica de fase reversa Kromasil C18 (250x50mm, d.i. 4,6 μ m) con sistema de termostato de columna (Spectra Physics 8792, San José, CA, USA). Se utilizó el sistema Agilent1260 equipado con una bomba cuaternaria y un detector DAD-UV HP1100 controlado con el software HP Chem Station. El volumen de muestra inyectado fue de 20 μ L y la detección se hizo con longitudes de onda en el rango del espectro UV-Visible entre 210nm y 380nm. Las diferentes familias de polifenoles tienen máximos de absorción a longitudes de onda concretas: 280nm para flavonoles y ácidos hidroxibenzoicos, 306nm para estilbenos, 320nm para ácidos hidroxicinámicos y 370nm para flavanoles; si bien a una longitud de onda de 210nm se pueden detectar la mayoría de los polifenoles.

Para la separación de los polifenoles de los extractos se probaron diferentes métodos de análisis diseñados a partir de métodos previamente descritos para la caracterización de polifenoles de extractos de semillas, orujo y hollejos de uva o de vino²¹⁰⁻²¹². En primer lugar, se ensayaron métodos de elución isocráticos (MEI), en los que se mantienen constantes las proporciones de los solventes de la fase móvil durante el desarrollo de la cromatografía. Se hicieron diferentes ensayos variando los tiempos de elución, la composición de la fase móvil, la temperatura y el caudal (Tabla 4).

Tabla 4. Métodos de elución isocráticos ensayados en el HPLC.

Código	Composición de la fase móvil			Caudal (ml/min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
	<i>Solvente A</i>	<i>Solvente B</i>	<i>Solvente C</i>			
MEI1a	Agua:acético (99:1) 50%	Acetonitrilo (50%)		1	30	20
MEI1b	Agua:acético (99:1) 50%	Acetonitrilo (50%)		0,5	30	20
MEI1c	Agua:acético (99:1) 70%	Acetonitrilo (30%)		0,5	30	20
MEI1d	Agua:acético (99:1) 30%	Acetonitrilo (70%)		0,5	30	20
MEI1e	Agua:acético (99:1) 69%	Acetonitrilo (16%)	Metanol 15%	0,85	25	20
MEI1f	Agua:acético (99:1) 69%	Acetonitrilo (16%)	Etanol 15%	0,85	25	20
MEI2a	Agua:acético (99:1) 65,4%	Acetonitrilo (19,6%)	Metanol 15%	0,65	30	35
MEI2b	Agua:fosfórico (99:1) 65,4%	Acetonitrilo (19,6%)	Metanol 15%	0,65	30	35
MEI3	Agua:fórmico (99:1) 65,4%	Acetonitrilo (19,6%)	Metanol 15%	0,65	30	35

También, se analizaron métodos de elución en gradiente (MEG), en los que la composición de la fase móvil varía con el tiempo. En la tabla 5 se muestran las diferentes condiciones de elución que se han probado, en nuestro caso, con un gradiente del solvente apolar, variando el tiempo, el caudal, la temperatura y la composición de la fase móvil.

Tabla 5. Condiciones de elución en gradiente ensayadas en el HPLC.

Código	Composición de la fase móvil			Caudal (ml/min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
	minuto	Solvente A Agua:formico (99,9:0,1) (v/v)	Solvente B Acetonitrilo			
MEG1	0	70%	30%	0,3	30	16
	3	60%	40%			
	6	50%	50%			
	9	35%	65%			
	11	30%	70%			
	14	70%	30%			
	14,5	70%	30%			
MEG2	0	90%	10%	1	30	16
	1	82%	18%			
	3	80%	20%			
	6	74%	26%			
	9	66%	34%			
	11	50%	50%			
	14	20%	80%			
15	90%	10%				
MEG3	0	90%	10%	0,5	30	35
	5	82%	18%			
	12	80%	20%			
	20	67%	33%			
	28	65%	35%			
	31	50%	50%			
	32	20%	80%			
33	90%	10%				
MEG4	0	100%	0%	0,5	30	45
	5	100%	0%			
	8	80%	20%			
	11	73%	27%			
	13	65%	35%			
	20	55%	45%			
	23	45%	55%			
	28	37%	63%			
	32	30%	70%			
	37	20%	80%			
40	20%	80%				
40,05	100%	0%				

El método de elución MEG4 fue el que permitió la mejor resolución de los polifenoles y, por tanto, el seleccionado para el análisis posterior de los polifenoles de los extractos de mosto mediante HPLC-MS (Figura 17).

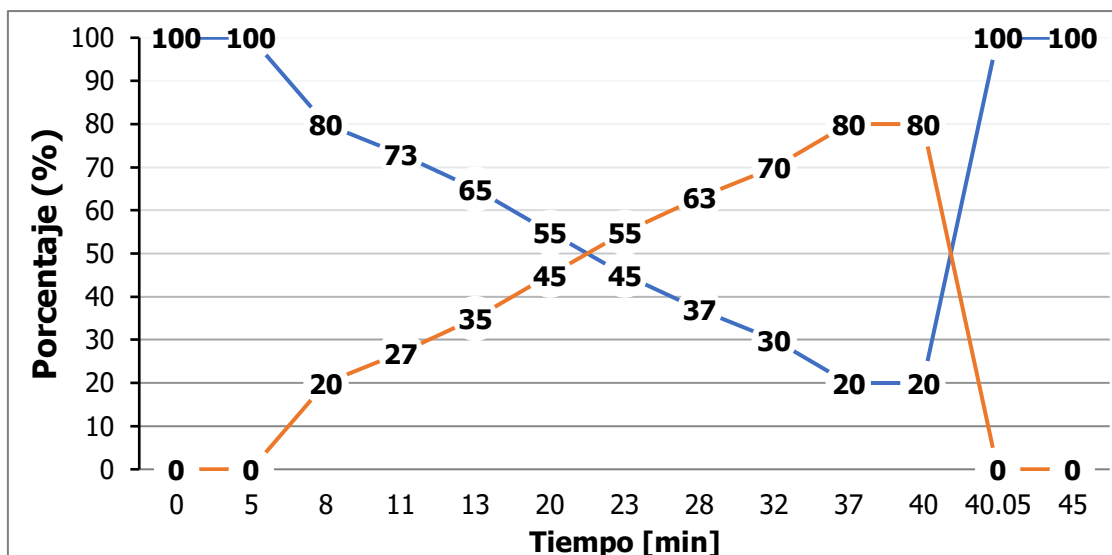


Figura 17. Diagrama de la composición de la fase móvil en el método de elución MEG4 seleccionado para la separación de polifenoles por HPLC. La línea azul representa el agua milli Q acidificada al 0,1% con ácido fórmico. La línea naranja representa el acetonitrilo.

3.2.6. Identificación y cuantificación de polifenoles mediante espectrometría de masas (MS).

La cuantificación de los polifenoles de los extractos de mosto de uva se realizó mediante la técnica de espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-MS). Se utilizó el equipo Qtrap4500, de Sciex (Darmstadt, Alemania). Este equipo posee tres cuadrupolos (Q1, Q2, Q3), de los cuales, el segundo actúa como celda de colisión, y una trampa iónica para acumular los iones de las moléculas de los polifenoles y los fragmentos resultantes. El tiempo total del análisis de cada molécula tiene una duración de 30 milisegundos. La ionización de las moléculas individuales, que llegan al espectrómetro de masas tras la separación por HPLC, se realiza mediante ionización por *electrospray* (ESI), con un potencial de ionización de 5500V en modo de ionización positivo y 4500V en modo de ionización negativo, a una temperatura de 500°C y 50 psi. Se trabajó con los espectros resultantes de las muestras en un rango de relación masa/carga [m/z] de 50 a 500 Da. El volumen de muestra inyectada para el análisis por masas fue de 5µL.

3.2.6.1. Base de datos de polifenoles para su cuantificación mediante espectrometría de masas.

Para poder identificar y cuantificar polifenoles concretos en los extractos de mosto, se creó una base de datos que incluyese los parámetros de espectrometría de masas necesarios para la identificación de estos compuestos en una mezcla compleja. Para ello, a partir de estudios previos realizados en la uva y productos derivados ^{210, 213}, se creó una tabla de polifenoles con sus parámetros moleculares (Tabla I de Anexos). A partir de este listado, se continuó la búsqueda bibliográfica para determinar qué polifenoles del listado anterior habían sido previamente identificados por esta técnica. Se identificaron parámetros de ionización para 56 polifenoles distintos (Tabla II de Anexos) ²¹⁴⁻²²⁸. A partir de estos datos, se seleccionaron 24 compuestos como representantes de las familias de polifenoles habitualmente presentes en la uva y sus derivados, que además estaban accesibles comercialmente (Tabla 2). Se trabajó con los 24 polifenoles seleccionados para determinar los parámetros de ionización y fragmentación en el equipo QTrap4500 utilizado en este trabajo (Tabla II Anexos). Esta base de datos se utilizó como referencia para la identificación y cuantificación de estos 24 polifenoles en los extractos de mosto objeto de estudio de esta tesis. Los datos cuantitativos se adquirieron con el programa Analyst 1.7 (Sciex) y las cuantificaciones se realizaron con el programa MultiQuant 3.0 (Sciex).

3.2.7. Metodología de revisión sistemática y meta-análisis.

La revisión sistemática y el meta-análisis sobre el efecto de los polifenoles de uva en células tumorales de leucemia humana, se ha realizado siguiendo la metodología propuesta en el manual Cochrane¹⁸² que, aunque es específica para la evaluación de estudios clínicos, se puede adaptar al análisis de datos empíricos obtenidos en estudios *in vitro*. Además, se han seguido las directrices recogidas en la guía PRISMA para la realización de revisiones sistemáticas y meta-análisis^{184-186, 229}.

Una revisión sistemática, comienza con el planteamiento de una pregunta de investigación que se quiere responder y en función de dicha pregunta se organiza todo el trabajo de investigación. A continuación, se realiza una búsqueda bibliográfica de todo tipo de referencias publicadas, analizando las bases de datos de bibliografía existente, congresos, y demás archivos publicados. Los estudios se seleccionan definiendo unos criterios de inclusión y exclusión referidos a la pregunta de estudio. La selección de los artículos se realiza por pares, para lograr una mayor objetividad de la investigación. Después, se extraen todos los datos de los artículos seleccionados, que responden a la pregunta de investigación formulada. Por último, se organizan los datos y se realiza el estudio estadístico para extraer conclusiones.

3.2.7.1. Estrategia de búsqueda bibliográfica.

De acuerdo con las pautas de la guía PRISMA, se realizó una búsqueda bibliográfica sistemática de publicaciones científicas de los últimos 50 años. Para la búsqueda de las referencias, se estableció una estrategia de búsqueda con términos controlados, consultados en PubMed, utilizando el siguiente criterio de consulta: "(uva) Y (polifenol) Y (leucemia)". La búsqueda se hizo en las bases de datos PubMed²³⁰, Biblioteca Cochrane²³¹, EMBASE²³², MEDLINE²³³ y CINAHL²³⁴. Todos los idiomas fueron aceptados y como resultado se generó un archivo (.ris) empleando el gestor de referencias EndNote.

3.2.7.2. Revisión por pares.

La revisión por pares es la evaluación del trabajo realizada por una o más personas con competencias similares a las de los productores del trabajo (pares). Es una manera de autorregulación interna de los miembros, que evalúan una selección de trabajos de investigación, dentro de un campo relevante. La metodología de revisión por pares se emplea para mantener estándares de calidad, mejorar el rendimiento de trabajo y proporcionar mayor credibilidad al estudio. En el ámbito académico, se realiza la revisión por pares para determinar la idoneidad de un artículo para su selección o publicación.

El archivo de referencias bibliográficas (.ris) fue exportado al programa específico COVIDENCE²³⁵, con el fin de facilitar la coordinación del equipo de revisores, de tal forma que uno de los autores (Daniel García) revisó la totalidad de los artículos y los otros autores revisaban por pares; el último autor resolvía los posibles conflictos. El equipo de revisores fue el que se describe a continuación:

- Daniel García Martínez, doctorando, Universidad Francisco de Vitoria.
- Dr. Cruz Santos Tejedor, profesor titular, Universidad Francisco de Vitoria.
- Dr. Carlos Martín Saborido, investigador, Hospital Universitario La Paz.
- Dr. Javier Calzada Funes, investigador, Universidad de Zaragoza.

3.2.7.3. Extracción de datos y criterios de selección.

La extracción de datos de los estudios seleccionados se realizó siguiendo el procedimiento estandarizado recogido en la guía PRISMA, utilizando los siguientes criterios de inclusión: 1) ensayos controlados, en nuestro caso datos experimentales procedentes de ensayos con controles en cada experimento; 2) estudios realizados con cultivos primarios o líneas celulares de leucemia humana; 3) estudios con polifenoles puros o con extractos de polifenoles derivados de la uva. Los criterios de exclusión fueron: 1) ensayos no controlados y 2) uso de polifenoles que no estén presentes en la uva.

A partir de los datos experimentales, se creó una base de datos incluyendo la siguiente información: 1) nombre completo del autor, 2) año de publicación, 3) nombre de los polifenoles, 4) concentración de polifenoles, 5) tipo de células de leucemia, 6) efecto sobre la proliferación celular.

3.2.7.4. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los datos incluidos en el meta-análisis se realizó utilizando el software Review Manager 5.3¹⁸⁷. Se estableció un intervalo de confianza (IC) del 95% para todos los resultados. Nuestro estudio trata de determinar si los polifenoles de uva tienen efecto positivo o negativo sobre las células de leucemia. Hay dos métodos de comparación de los datos, que son: analizar el *odds ratio* (OR) o el *risk ratio* (RR)^{236, 237}. El análisis OR es el método recomendado para evaluar las variables dicotómicas como la nuestra, no obstante, dada la frecuencia aleatoria del efecto del compuesto evaluado, pudiendo agregar falsos positivos o negativos al estudio, sesgando el resultado final y sobrestimando de este modo el riesgo relativo, no es un método adecuado. En nuestro caso, se estimó un riesgo relativo superior al 10% y por ello se utilizó el análisis RR. La heterogeneidad de los datos se midió mediante la prueba de Chi² y el estadístico I², que representa la variación total debido a la heterogeneidad, por lo que los valores de I² superiores al 50% indican una heterogeneidad elevada ^{236, 237}. El nivel de significación del análisis se definió como un *p value* menor a 0,05 y se usó un efecto aleatorio (RE), en lugar de un efecto fijo (FE), porque el efecto de los polifenoles puede cambiar según el compuesto utilizado y las células de leucemia tratadas; es decir, que se toma como hipótesis, que la variación entre los estudios no solamente es debida al azar, sino que existen otras razones relativas a los objetos de estudio. Los parámetros que se pudieron fijar en este estudio fueron: la concentración de polifenol, las condiciones de crecimiento, el tiempo de incubación en presencia del compuesto y las líneas celulares de leucemia utilizadas. También se realizó el análisis de subgrupos para identificar la fuente de heterogeneidad.

RESULTADOS



4. Resultados.

4.1.Extracción y análisis de polifenoles del mosto.

Para determinar el mejor método de extracción de polifenoles de las muestras de mosto, se hicieron pruebas simultáneamente con una mezcla de polifenoles comerciales y con muestras de mosto. La muestra control se hizo con 7 compuestos comerciales, representantes de las principales familias de polifenoles del mosto, disueltos en agua a una concentración de 15mg/L cada uno: ácidos gálico y vanílico como representantes de los ácidos hidroxibenzoicos, ácido cafeico como representante de los ácidos hidroxicinámicos, catequina y epicatequina como representantes de los flavanoles, quercetina como flavonol, y polidatina que es precursor del resveratrol y pertenece a la familia de los estilbenos.

Se ensayaron tres métodos de extracción. Primero se realizó una extracción directa con tres solventes distintos: etanol, metanol y acetona (apartado 3.2.2.1 de materiales y métodos). En el segundo procedimiento se solidificó la muestra con arena de sílice antes de la extracción de los polifenoles (apartado 3.2.2.2 de materiales y métodos). En el último procedimiento se utilizaron muestras de mosto liofilizadas (apartado 3.2.2.3 de materiales y métodos).

Para determinar la eficiencia de la extracción, los extractos de polifenoles obtenidos se analizaron mediante HPLC, utilizando un método de elución isocrático con fase móvil compuesta por agua acidificada con ácido fórmico 99,9:0,1 (v/v), acetonitrilo y metanol en una proporción [65,4:19,6:15] (método MEI3, tabla 4 de materiales y métodos).

4.1.1. Extracción de polifenoles de forma directa con solventes.

Este método consistió en mezclar un volumen de muestra con el solvente a analizar (metanol, etanol o acetona) a diferentes pH (2.25, 7 y 9.25), en proporciones 1:1, 1:2, 1:4, 1:5 y 1:10 (v/v). La mezcla se incubó con agitación suave durante 5, 10, 30, 60, 120 y 240 minutos a temperatura ambiente o a 4°C y a continuación las muestras se centrifugaron para eliminar el material insoluble. El sobrenadante con los polifenoles en solución se analizó mediante HPLC para determinar la eficiencia de la extracción. Se hicieron extracciones con la mezcla control de polifenoles y se determinó que las mejores

condiciones de extracción se daban utilizando metanol a pH neutro en proporción 5:1 con un tiempo de incubación de 120 minutos a 4°C.

En la figura 18 se muestra el perfil de polifenoles del extracto de la muestra patrón obtenido utilizando las condiciones de extracción previamente descritas y resueltos con el método de elución isocrático MEI3. Se puede observar una buena resolución de los 7 polifenoles de la muestra, siendo el ácido gálico el primero en eluir y la quercetina el último. Con el método de elución MEI3 los ácidos benzoicos eluyen primero, seguidos de los flavanoles, ácidos hidroxicinámicos, estilbenos y, por último, el flavonol.

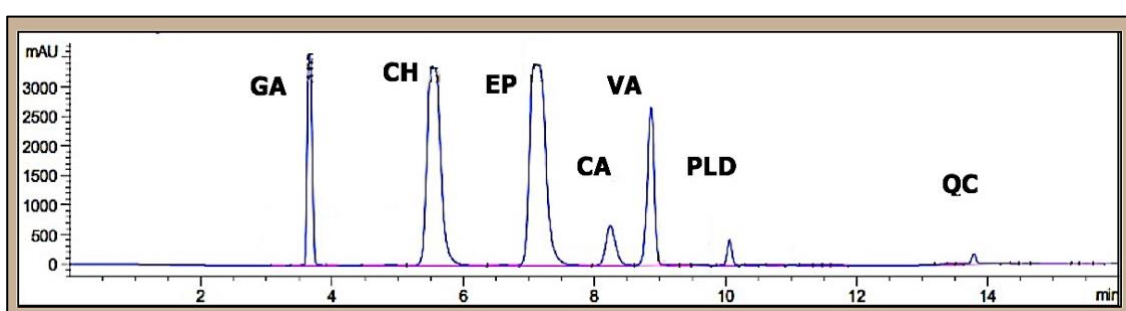


Figura 18. Cromatograma HPLC a 210nm del extracto de polifenoles de la muestra control resueltos con el método de elución isocrático MEI3. Ácido gálico (GA), catequina (CH), epicatequina (EP), ácido cafeico (CA), ácido vanílico (VA), polidatina (PLD), quercetina (QC).

La detección y cuantificación de los polifenoles se ha realizado en base a las rectas de calibrado generadas para cada polifenol con el HPLC, utilizando diferentes concentraciones entre 2µg/L y 2g/L. En la Tabla 6 se muestran las ecuaciones de las rectas de calibrado de los 7 polifenoles patrón en base a las cuales se han realizado las cuantificaciones.

Tabla 6. Ecuaciones de la recta para cada polifenol analizado.

	Ecuación de la recta	Valor r²
Ácido gálico	$y = 0,361x - 0,083$	0,99333
Catequina	$y = 0,3023x + 0,1142$	0,99253
Epicatequina	$y = 0,2464x + 0,2211$	0,99388
Ácido cafeico	$y = 0,4076x - 0,2298$	0,99562
Ácido vanílico	$y = 0,4508x - 0,3163$	0,99056
Polidatina	$y = 0,2225x + 0,3036$	0,99029
Quercetina	$y = 0,3325x - 0,0063$	0,99202

Para determinar el porcentaje de recuperación se realizó utilizando como referencia de comparación el pico que se obtiene tras inyectar una cantidad de polifenol en el HPLC en las condiciones de extracción seleccionadas (proporción 5:1 (v/v) metanol/muestra). La recuperación de los ácidos es muy buena, siendo de un 99% para ácido gálico, 90% para ácido cafeico y un 73% para el ácido vanílico. También la catequina y la epicatequina, se solubilizaron muy bien con una detección del 83% y 87% respectivamente. En el caso de la polidatina y la quercetina se obtuvieron eficiencias algo más bajas, de un 63% y 67% respectivamente (Tabla 7).

Tabla 7. Cuantificación (mg/L) de los polifenoles extraídos de la muestra control con los solventes estudiados. Nd = no detectado. GA: ácido gálico, EP: epicatequina, CH: catequina, CA: ácido cafeico, VA: ácido vanílico, PLD: polidatina, QC: quercetina.

Solvente	Concentración polifenol (mg/L)						
	GA	CH	EP	CA	VA	PLD	QC
Metanol [pH 7]	15,05	12	12,5	13	10,05	9,4	9,95
Metanol 50% [pH 7]	14,3	10,5	11,05	12,1	9,45	8,8	9,45
Etanol [pH 7]	12,85	10,05	10,7	11,95	9,05	8,75	9,1
Metanol [pH 2,25]	13,35	9,9	10,75	12,5	9,55	8,75	9,25
Metanol 50% [pH 2,25]	13	9,25	10,05	11,55	9,4	8,3	8,25
Etanol [pH 2,25]	12	8,85	9,9	11,65	8,75	8,05	7,8
Metanol [pH 9,25]	12,1	9,1	8,85	11,05	8,3	6,3	7,2
Metanol 50% [pH 9,25]	11,55	8,5	8	10,95	8,05	6,1	6,7
Etanol [pH 9,25]	11,1	7,5	8,3	10,8	7,8	5,95	6,45
Acetona [pH 2,25]	Nd	Nd	Nd	6,05	1	3,3	3,75
Acetona [pH 7]	Nd	Nd	Nd	1,5	0,75	3,05	3,9
Acetona pH [9,25]	Nd	Nd	Nd	1	Nd	1,95	2,3

En los extractos obtenidos con etanol como solvente, los datos de concentración son, de media, un 13% inferiores a los registrados con metanol absoluto o al 50%. En los extractos obtenidos con acetona, algunos de los polifenoles de la muestra no se detectaron, posiblemente porque es un solvente apolar que solubiliza bien los flavonoles, pero es poco eficiente para solubilizar los polifenoles polares. Por último, independientemente del solvente utilizado, la acidificación del solvente siempre generó mejores resultados de extracción que la alcalinización, pero en ningún caso se mejora el rendimiento de los solventes a pH neutro (Tabla 7).

Una vez determinado que el metanol a pH 7 era un buen solvente para solubilizar la mayoría de los polifenoles presentes en la mezcla patrón, se evaluó este método de extracción con las muestras de mosto. Se comenzó analizando las muestras de mosto Airén tomadas en tres estadios del proceso de concentración: inicial, medio y final. Tras la extracción, 20µL de cada extracto se resolvieron mediante HPLC utilizando el método de elución MEI3. Como se muestra en la figura 19, los cromatogramas de estos extractos muestran mayor número de picos debido a la mayor complejidad polifenólica del mosto frente a la muestra de patrones. Con este método de elución la mayoría de los polifenoles de la muestra se resuelven en los primeros 10 minutos de la cromatografía y se pueden apreciar diferencias en el perfil de compuestos detectados, lo que podría indicar cambios en la estructura molecular de los polifenoles del mosto asociados al proceso de concentración. Además, al comparar los cromatogramas de las tres muestras, se observa un incremento en las unidades de absorbancia relativas asociadas a los polifenoles presentes en cada muestra, lo que indica una mayor concentración de polifenoles en las muestras de mosto concentrado, algo que era de esperar.

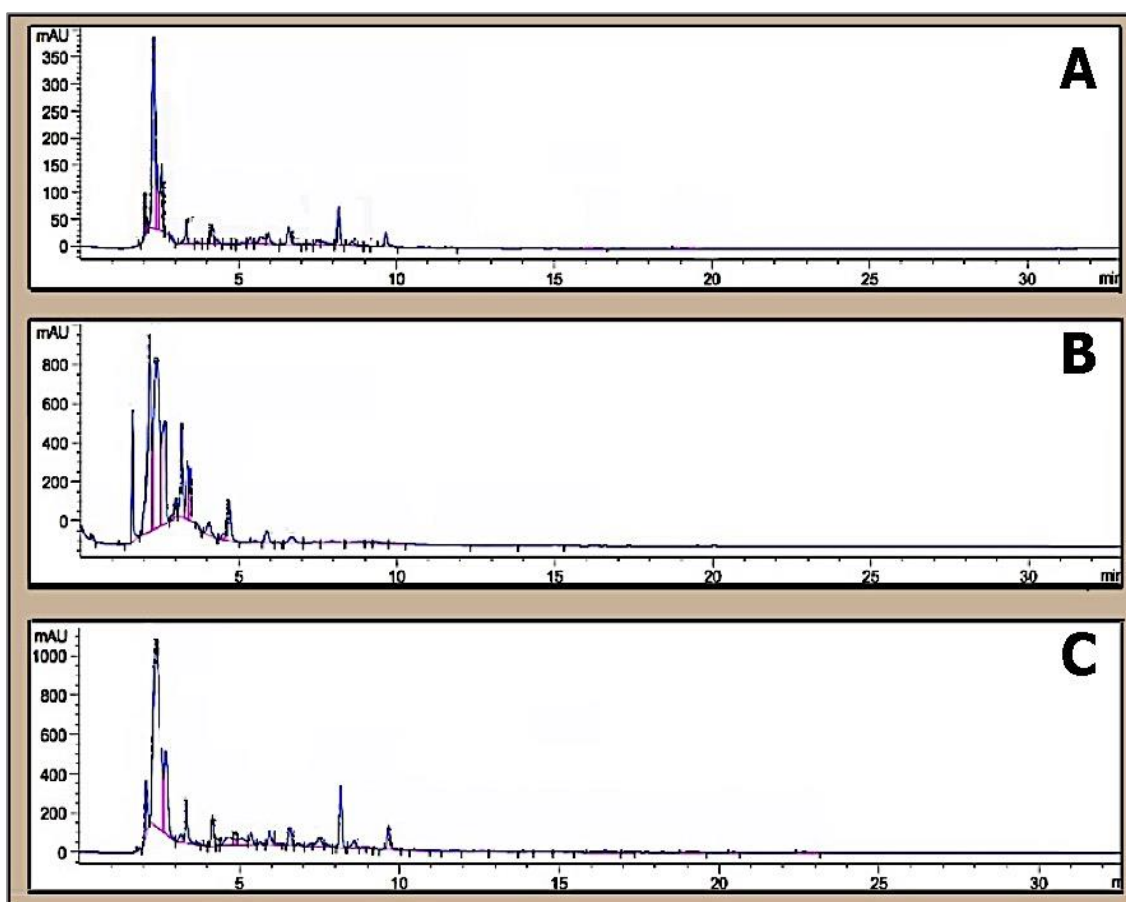


Figura 19. Cromatogramas HPLC a 210nm de extractos de mosto Airén en las distintas etapas del proceso de concentración industrial. A) MCNi, B) MCNm, C) MCNf.

4.1.2. Extracción de polifenoles sólido-líquido.

Este método consiste en solidificar las muestras de mosto con arena de sílice como paso previo a la extracción con metanol (apartado 3.2.2.2 de materiales y métodos). Se probó primero con la muestra de patrones a concentración 15mg/L. Los resultados del HPLC y la cuantificación de los polifenoles extraídos por este método muestran que el porcentaje de detección oscila entre el 85% para el ácido gálico y el 57% de la quercetina, por lo que el rendimiento no es mejor que con el método anterior (Figura 20, Tabla 8).

Tabla 8. Cuantificación (mg/L) de los polifenoles extraídos con metanol [pH 7] de la muestra solidificada con arena de sílice. GA: ácido gálico, EP: epicatequina, CH: catequina, CA: ácido cafeico, VA: ácido vanílico, PLD: polidatina, QC: quercetina.

Solvente	Concentración polifenol (mg/L)						
	GA	CH	EP	CA	VA	PLD	QC
Metanol [pH 7]	12,7925	10,8	11,25	11,475	9,35	7,52	8,4575

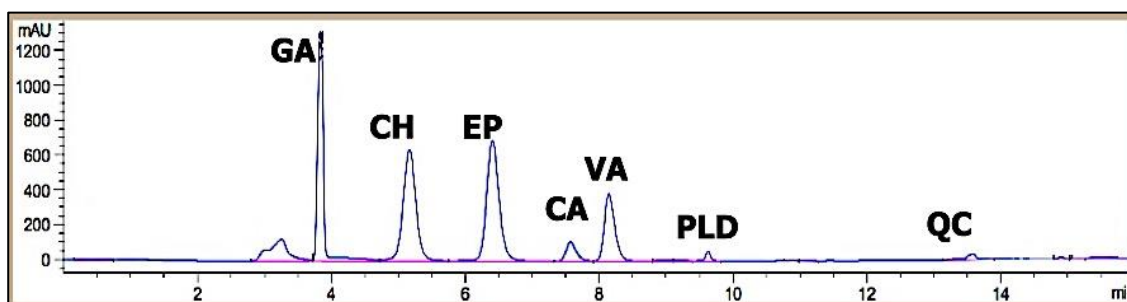


Figura 20. Cromatograma HPLC a 210 nm de los polifenoles de la muestra control extraídos por el método de arena de sílice. Ácido gálico (GA), catequina (CH), epicatequina (EP), ácido cafeico (CA), ácido vanílico (VA), Polidatina (PLD), quercetina (QC).

También se aplicó este método a muestras de mosto Airén, en las distintas etapas del proceso de concentración industrial. Los extractos obtenidos se analizaron mediante HPLC y, como se puede ver en la Figura 21, el perfil de los polifenoles en las distintas etapas de la concentración del mosto normal es similar, pero hay diferencia en las unidades de absorbancia, como es de esperar, por el proceso de concentración. Sin embargo, los cromatogramas obtenidos indican una menor complejidad polifenólica que los obtenidos con el método de solubilización directa con metanol.

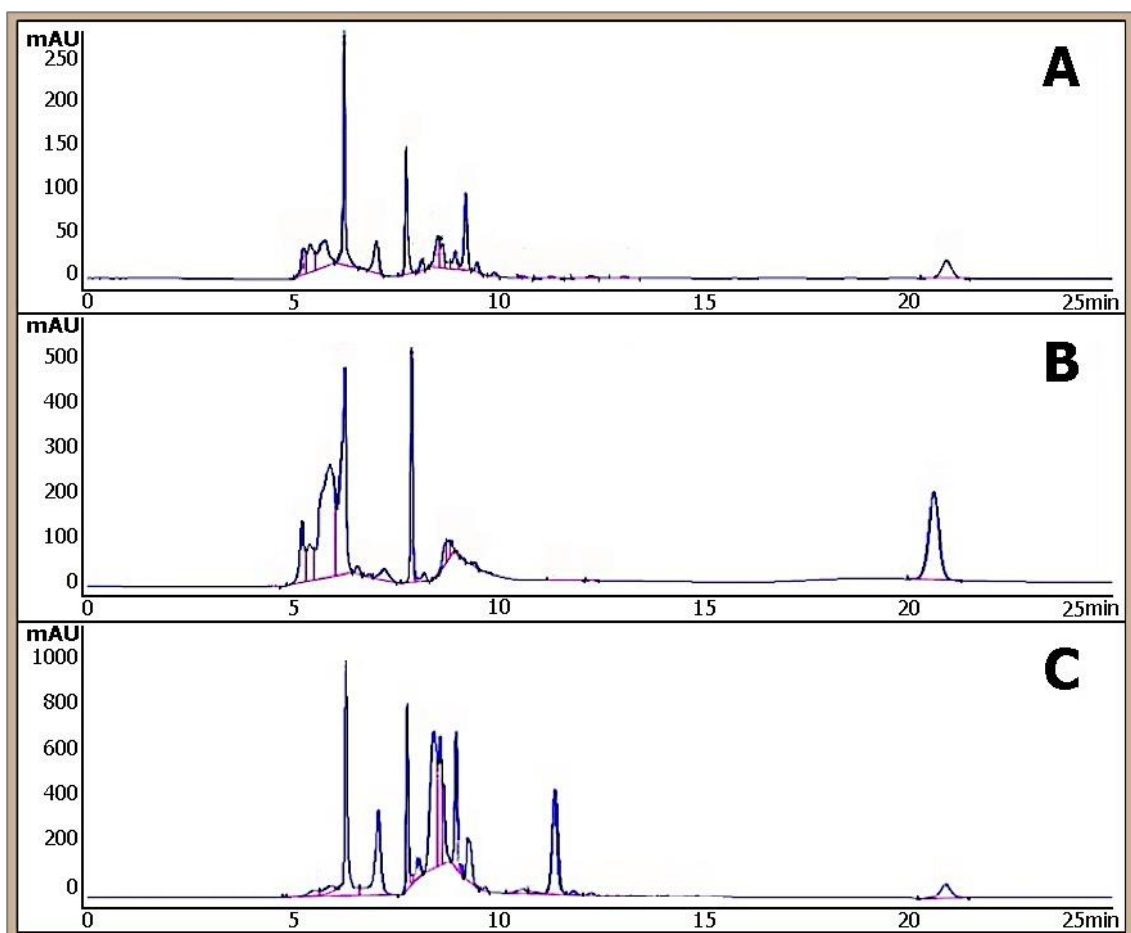


Figura 21. Cromatogramas HPLC a 210nm de los polifenoles extraídos por el método de solidificación con arena de sílice resueltos con el método de elución MEI3. A) MCNi B) MCNm. C) MCNf.

4.1.3. Extracción de polifenoles de muestras de mosto liofilizado.

Este método consistió en utilizar muestras de mosto liofilizadas como matriz para la extracción (apartado 3.2.2.3. de materiales y métodos). Como en los casos anteriores, primero se analizó la muestra control con los 7 polifenoles conocidos a una concentración de 15mg/L. Se tomaron 0,2ml de muestra, se congelaron a -80°C y se liofilizaron. A continuación, se realizó la extracción de polifenoles con metanol y los extractos obtenidos se analizaron mediante HPLC, para verificar que se extraían todos los polifenoles de la mezcla y calcular la eficiencia, que en este caso osciló entre el 94% para el ácido gálico y el 83% para quercetina (Figura 22 y Tabla 9). Estos datos no son mejores que los obtenidos con la extracción directa con metanol, si bien hay que destacar que estos extractos permitieron el análisis posterior mediante MS, algo que no se pudo

hacer con los extractos obtenidos mediante el primer método ya que no se conseguía ionizar adecuadamente los compuestos a analizar.

Tabla 9. Cuantificación (mg/L) de los polifenoles extraídos por el método de liofilización de la muestra. GA: ácido gálico, EP: epicatequina, CH: catequina, CA: ácido cafeico, VA: ácido vanílico, PLD: polidatina, QC: quercetina.

Solvente	Concentración polifenol (mg/L)						
	GA	CH	EP	CA	VA	PLD	QC
Metanol [pH 7]	14,89	13,2	13,75	14,85	13,2	13,16	12,44

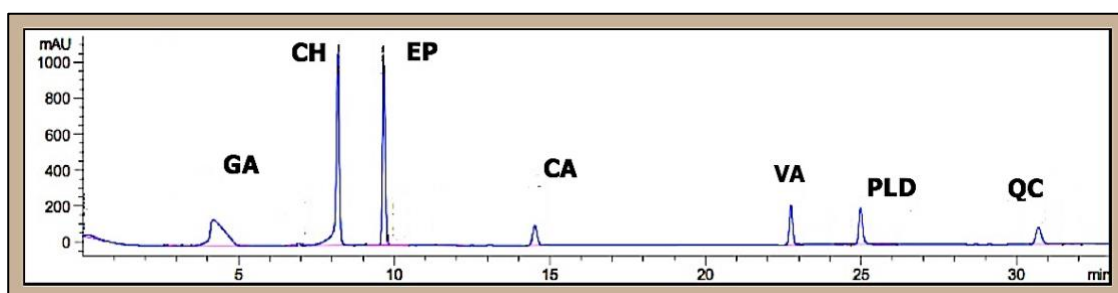


Figura 22. Cromatograma HPLC a 210nm del extracto de la muestra control obtenido con el método de extracción por liofilización eluido con el método MEI3. Por orden de elución: ácido gálico (GA), Hidrato de catequina (CH), epicatequina (EP), ácido cafeico (CA), ácido vanílico (VA), polidatina (PLD), y quercetina (QC).

Este método de extracción se aplicó a muestras de mosto de los diferentes varietales. El análisis de los extractos mediante HPLC permitió apreciar gran complejidad en el perfil cromatográfico de las muestras, así como una mayor intensidad en las unidades de absorbancia del mosto Tempranillo (Figura 23E) frente a los mostos de las variedades blancas: Airén (Figura 23A), Gewürztraminer (Figura 23B), Sauvignon blanc (Figura 23C), Verdejo (Figura 23D). Este resultado era algo esperable puesto que Tempranillo es una variedad tinta muy rica en polifenoles y por ello se ha incluido en el estudio, como control y referencia frente al resto de variedades blancas estudiadas.

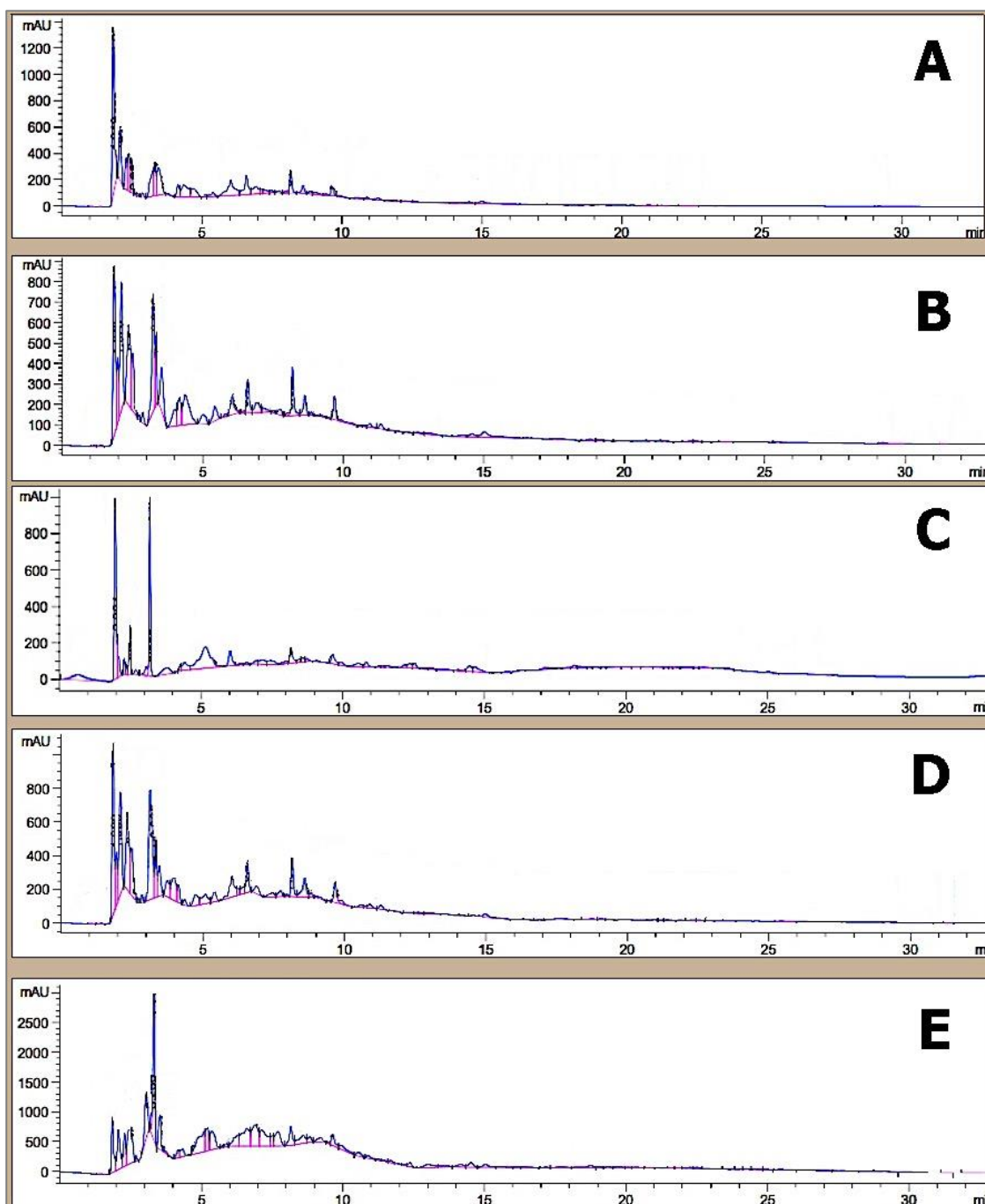


Figura 23. Cromatogramas HPLC a 210nm de los extractos de polifenoles obtenidos a partir de mosto liofilizado de las variedades Airén (A), Gewürztraminer (B), Sauvignon blanc (C), Verdejo (D) y Tempranillo (E).

Todos los extractos de polifenoles obtenidos por los tres métodos anteriormente descritos se analizaron mediante HPLC-MS. Los extractos obtenidos mediante los métodos de extracción directa con solventes y solidificación con sílice no generaron resultados satisfactorios, quizás por algún componente presente en las muestras que interfiere en la ionización de las moléculas. Los extractos obtenidos a partir de las

muestras de mosto liofilizadas sí permitieron obtener resultados satisfactorios en el espectrómetro de masas, por lo que este método se seleccionó para la extracción de polifenoles de todas las muestras de mosto incluidas en este estudio.

4.2.Cuantificación de polifenoles totales en los mostos por técnicas espectrofotométricas.

Para tener una estimación de la cantidad total de polifenoles en los mostos originales y los extractos se utilizó la espectrofotometría. Esta técnica permite cuantificar polifenoles totales en base a su estructura química y su capacidad de absorción de luz de longitudes de onda en el rango de la luz UV. Para ello, se realizó una recta de calibrado, utilizando ácido gálico en un intervalo de concentración comprendido entre 2mg/L y 2 g/L, con 10 puntos intermedios equidistantes. Con las lecturas de absorbancia a 280nm, se obtuvo la ecuación de la recta ($y = 0,0179x - 0,0376$; $R^2 = 0,9998$) que se ha utilizado para interpolar los datos de absorbancia de las muestras en estudio y determinar la concentración total de polifenoles, en mg/L equivalentes de ácido gálico (GAE) (Tabla 10 y figura 24). Estos datos muestran, que el mosto de la variedad tinta Tempranillo tiene un contenido total de polifenoles bastante mayor que los mostos de uva blanca, algo que era de esperar, en base a estudios previos. En concreto el contenido en polifenoles del mosto Tempranillo es un 30% mayor que Gewürztraminer, un 52% mayor que Sauvignon blanc, un 54% mayor que Airén y un 70% mayor que Verdejo. Según estos datos los mostos Airén y Sauvignon blanc tienen una cantidad similar de polifenoles totales, que suponen un 35-37% más que la cantidad presente en Verdejo que es el más pobre en polifenoles. El mosto blanco con mayor contenido en polifenoles es el de la variedad Gewürztraminer, con un 33% más que el mosto Airén.

Al comparar los datos de los extractos con los de los mostos se ve que el proceso de extracción conlleva pérdida de polifenoles y el porcentaje de pérdida varía en función del varietal, siendo de un 7,5% para la variedad Verdejo, un 15% en Airén, un 19,4% en Gewürztraminer, un 24,7% en Sauvignon blanc y un 33,2% en Tempranillo (Figura 24, Tabla 10). La mayor pérdida se produce en el mosto tinto, que es el más rico en polifenoles, dato que habrá que tener en cuenta a la hora de discutir los resultados finales de cuantificación. Este resultado indica que el método de extracción utilizado no solubiliza todos los polifenoles de los mostos. Las diferencias en los porcentajes de pérdida pueden deberse al tipo de polifenoles presentes en las muestras, en concreto

en el mosto Tempranillo, rico en proantocianidinas y taninos, es posible que estos compuestos más complejos estructuralmente sean menos solubles en disolventes polares. En el caso de las variedades blancas los porcentajes de pérdida varían bastante siendo sorprendente el elevado porcentaje del mosto Sauvignon blanc (24,7%). Los porcentajes de pérdida para las otras variedades son algo menores y por ello se consideró adecuado continuar con este estudio centrado en la variedad Airén utilizando este procedimiento de extracción.

Tabla 10. Contenido total de polifenoles en los mostos de los diferentes varietales y sus extractos, expresados en mg/L GAE.

	Polifenoles totales mg/L GAE				
	Airén	Gewürztraminer	S. blanc	Verdejo	Tempranillo
Mosto	752±47,5	1.128,8±6	785±66	490,81±23	1.639,1±22,8
Extracto	638,9±63	909,5±5,4	590,8±35	453,78±11	1.094,2±8,4

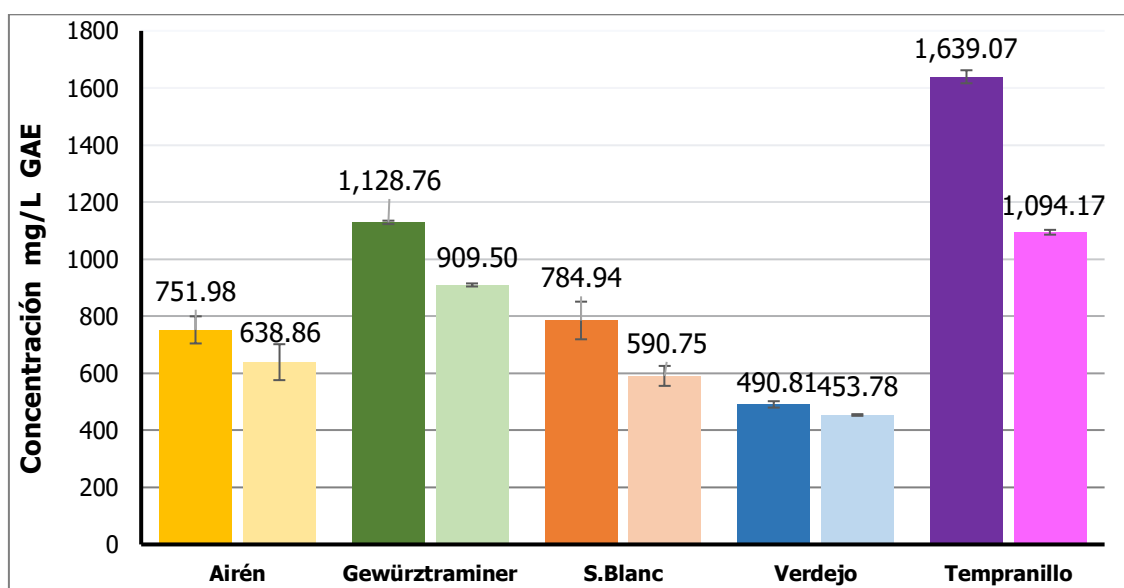


Figura 24. Concentración de polifenoles totales, expresada en equivalentes de ácido gálico (GAE) en las muestras de mosto (barra izquierda) y en los extractos (barra derecha) de los diferentes varietales en estudio.

Del mismo modo, se determinó la concentración de polifenoles totales en las muestras de mosto Airén en distintas etapas del proceso de concentración, mosto fresco a 19°Brix (MCNi), mosto a 30°Brix (MCNm) y mosto a 65°Brix (MCNf). Al comparar la concentración de polifenoles en el mosto concentrado con respecto al mosto inicial, se puede ver que ésta prácticamente se duplica (Tabla 11, Figura 25). No obstante, hay que tener en cuenta que los azúcares se concentran 3,4 veces en el mosto final, lo que

estaría indicando que el proceso de calentamiento del mosto para evaporar agua y concentrar los azúcares, está afectando negativamente a los polifenoles del mosto. En concreto, según estos datos, se estaría produciendo una pérdida del 42% de los polifenoles totales del mosto en el proceso de concentración. De igual modo, el proceso de extracción conlleva una pérdida de polifenoles, que en este caso oscila entre el 9,6% y el 5,9% en las muestras inicial y final respectivamente.

Tabla 11. Concentración de polifenoles totales en muestras de mosto normal en distintas etapas de concentración y sus extractos, expresados en mg/L GAE.

	Polifenoles totales (mg/L GAE)		
	MCNi	MCNm	MCNf
Mosto	477,4±13	648,6±10,3	927,6±38
Extracto	431,5±15,2	629,9±51,3	873,8±13,8

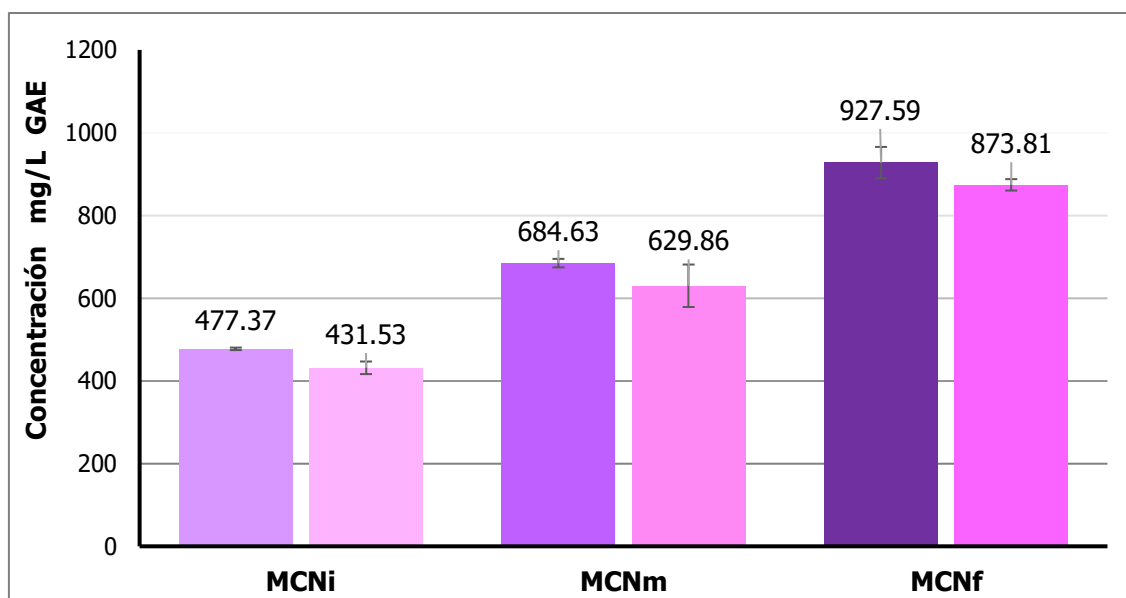


Figura 25. Concentración de polifenoles totales, expresada en equivalentes de ácido gálico (GAE) en las muestras de mosto normal Airén (barra izquierda) y sus extractos (barra derecha), en diferentes etapas del proceso de concentración: inicial (MCNi), medio (MCNm), final (MCNf).

También se cuantificaron los polifenoles totales de las muestras del proceso de obtención del mosto decolorado Airén, mosto fresco a 19°Brix (MCDi), mosto a 30°Brix (MCDm) y mosto a 65°Brix (MCDf). Al igual que en el caso anterior, los datos indican que el proceso de concentración conlleva una pérdida considerable de polifenoles, un 44% en este caso (Tabla 12, Figura 26). El proceso de extracción también conlleva una pérdida adicional de polifenoles que oscila entre el 15% en MCDi y el 33% MCDf.

Tabla 12. Concentración de polifenoles totales en el mosto decolorado en las distintas etapas de concentración y sus extractos, expresados en mg/L GAE.

	Polifenoles totales (mg/L GAE)		
	MCDi	MCDm	MCDf
Mosto	490±2	643,3±2,3	769±2
Extracto	348,3±30,7	423,2±11,6	515,6±12,5

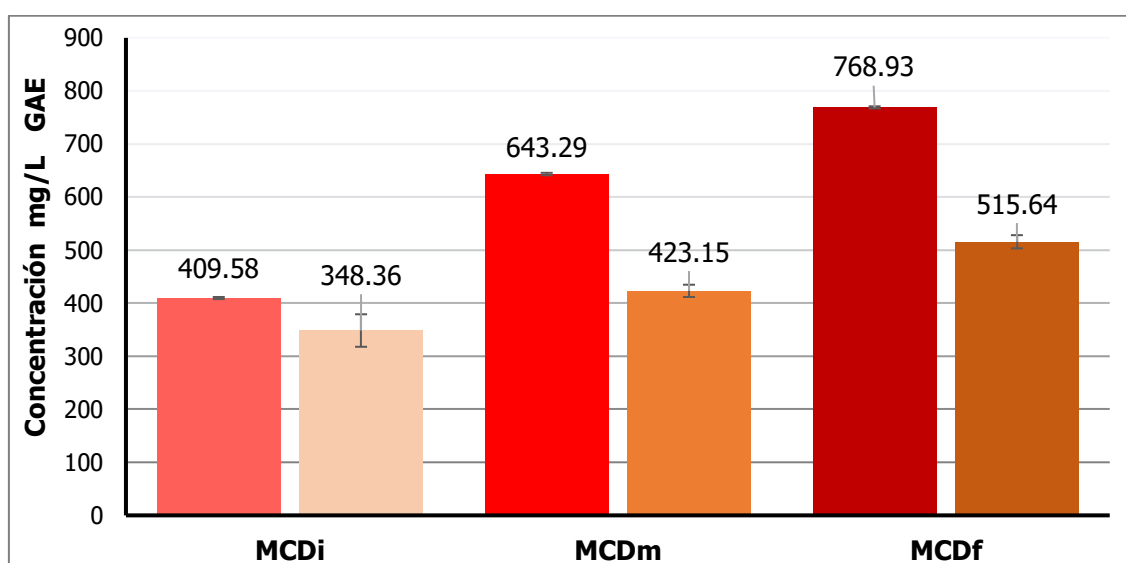


Figura 26. Concentración de polifenoles totales, expresada en equivalentes de ácido gálico (GAE) en las muestras de mosto decolorado Airén (barra izquierda) y sus extractos (barra derecha), en diferentes etapas del proceso de concentración: inicial (MCDi), medio (MCDm), final (MCDf).

Estos resultados en conjunto indican que el proceso de filtración al que se somete el mosto para su decoloración lleva asociado una pérdida de polifenoles de un 17% en el mosto concentrado decolorado frente al normal. Además, el proceso de extracción con metanol también se ve afectado, con pérdidas en la extracción del 33% en el caso del concentrado decolorado frente al 5,9% en el concentrado normal. La filtración afecta de algún modo a la matriz del mosto que hace que el proceso de extracción de polifenoles que se ha utilizado en el trabajo no sea tan eficiente como lo es en las muestras de mosto no sometidas al proceso de ultrafiltración.

Otro aspecto a destacar, es que las concentraciones de polifenoles en las muestras de mosto iniciales del proceso de concentración (MCNi, MCDi) (tablas 11 y 12), son aproximadamente un 40% más bajas, que las determinadas para el mosto fresco Airén

en el estudio de variedades (Tabla 10). Esto podría deberse a que, el estudio de mostos de variedades se realizó con muestras de mosto que venían directamente del prensado de la uva, mientras que el mosto Airén de las muestras MCNi y MCDi ha estado una media de 90 días almacenado a temperatura ambiente en grandes tanques a los que se les añadió 880ppm de sulfuroso. Durante este tiempo de almacenamiento en estas condiciones y dada la complejidad del mosto, es muy probable que se formen agregados moleculares que incluyan polifenoles que precipiten en los tanques y de ahí la disminución del contenido en polifenoles detectada.

4.3. Análisis de la capacidad antioxidante del mosto y los extractos de polifenoles.

Con el fin de determinar la capacidad antioxidante de los polifenoles presentes en los mostos y los extractos obtenidos, se ha utilizado el procedimiento del DPPH descrito en el apartado 3.2.4. de materiales y métodos. Se ha determinado el valor IC₅₀, que se define como la concentración necesaria de polifenol(es) para disminuir en un 50% la cantidad de radicales libres presentes en la reacción (DPPH+). Como referencia se utilizó ácido gálico y a partir de la recta obtenida ($y = -0,0051x + 0,4708$; $R^2 = 0,9926$) se estimaron los valores IC₅₀ de las muestras de mosto en mg/L GAE. Por lo tanto, cuanto menor sea el valor de IC₅₀, mayor es la actividad antioxidante del compuesto o extracto analizado ²⁰⁸.

En las condiciones de ensayo utilizadas en el trabajo, se obtuvo un valor IC₅₀ para ácido gálico de 43,76 mg/L, que normalizado a la cantidad de DPPH utilizada, dio un valor de IC₅₀ de 1,85 mg ácido gálico/g DPPH.

Los resultados obtenidos con los mostos y los extractos de polifenoles de los diferentes variedades muestran que la variedad Tempranillo es la que mayor capacidad antioxidante tiene, seguida de Gewürztraminer, Sauvignon blanc, Airén y Verdejo (Tabla 13). Por lo tanto, se puede decir que la capacidad antioxidante de los mostos y sus extractos es proporcional al contenido total de polifenoles de las muestras. Además, se aprecia que la pérdida de polifenoles totales durante el proceso de extracción también afecta a la capacidad antioxidante, con una reducción de alrededor del 15% en las muestras de mosto blanco y de un 27% en la variedad tinta Tempranillo.

Tabla 13. Capacidad antioxidante de los mostos y los extractos de polifenoles de los diferentes varietales de uva estudiados.

Varietal	IC ₅₀ (mg/gDPPH)	
	Mosto	Extracto
Airén	2,43±0,3	2,82±0,3
Gewürztraminer	1,78±0,4	2,14±0,4
Sauvignon blanc	2,36±0,3	2,75±0,4
Verdejo	2,82±0,3	3,21±0,3
Tempranillo	1,35±0,4	1,85±0,4

Al analizar las muestras de mosto de las etapas de concentración industrial, en todos los casos se obtienen valores IC₅₀ menores en el mosto normal que en el decolorado, lo que indica que tiene mayor capacidad antioxidante. Este dato apoya lo expuesto previamente, acerca del paso de filtración al que se somete el mosto para la decoloración, que conlleva una eliminación de polifenoles y reduce la capacidad antioxidante del mismo. También se aprecia, como en los resultados anteriores de los varietales, que los extractos de mosto tienen menor capacidad antioxidante que los mostos sin procesar, lo que estaría indicando que en el proceso de extracción con metanol hay polifenoles que no se extraen, posiblemente los de naturaleza más apolar, y tienen actividad antioxidante. No obstante, algo que merece la pena resaltar es, que aún con la pérdida de polifenoles que conlleva el proceso de concentración, los polifenoles que quedan en las muestras de mosto concentrado Airén tienen una buena capacidad antioxidante, en concreto para las muestras de las distintas etapas de concentración, tanto las muestras decoloradas (MCD) como normales (MCN) (Tabla 14).

Tabla 14. Capacidad antioxidante de los mostos y extractos de polifenoles de las diferentes etapas del proceso de concentración industrial.

	IC ₅₀ (mg/g DPPH)					
	MCDi	MCNi	MCDm	MCNm	MCDf	MCNf
Mosto	3,06±0,3	2,61±0,3	2,74±0,4	2,07±0,4	2,24±0,3	1,25±0,3
Extracto	3,28±0,3	2,95±0,3	3,05±0,4	2,55±0,4	2,58±0,4	1,49±0,4

Los resultados de espectrofotometría y los ensayos con DPPH sirven para tener una estimación de la concentración de polifenoles totales y su capacidad antioxidante, sin embargo, estas técnicas no permiten realizar una identificación y cuantificación precisa

de los polifenoles concretos presentes en el mosto. Para ello, se continuó con la caracterización de los polifenoles de los extractos del mosto mediante HPLC y, a continuación, se realizó su cuantificación mediante HPLC-MS.

4.4. Caracterización de los polifenoles extraídos del mosto mediante HPLC.

Una vez determinado, que el método de extracción de polifenoles a partir de mosto liofilizado utilizando metanol como solvente permitía una buena extracción, y posterior análisis, se procedió a identificar los polifenoles presentes en los extractos mediante HPLC. Para ello, se utilizó el equipo de HPLC Agilent1260, con una columna de fase reversa Kromasil C18 (250x50mm, d.i.4,6µm).

4.4.1. Separación de polifenoles por HPLC con método de elución isocrático.

La caracterización de la composición polifenólica de los extractos de mosto se comenzó utilizando diferentes métodos de elución isocráticos, en los que se mantienen constantes las proporciones de los solventes de la fase móvil durante el tiempo que dura la cromatografía^{41, 43, 238}. Todos los métodos de elución ensayados están descritos en la tabla 4 de materiales y métodos.

Antes de analizar los extractos de mosto, se utilizó la muestra control de 7 polifenoles a 15mg/L utilizada en los estudios previos. Se inyectaron 20µL de muestra en el HPLC y se resolvieron con los métodos de elución MEI1a, MEI1b, MEI1c y MEI1d (Figura 27). En todos ellos la fase móvil estaba compuesta por el solvente A (agua-acético 99:1 v/v) y el solvente B (acetonitrilo) y la elución tuvo lugar a 30°C durante 20 min. En los métodos MEI1a y MEI1b la proporción de los solventes fue 1:1 y la única diferencia era el caudal, que fue de 1mL/min en MEI1a y 0,5mL/min en MEI1b (Figura 27 A y B). A partir de los cromatogramas obtenidos, se estableció el flujo en 0,5mL/min y se hicieron nuevos ensayos variando la fase móvil compuesta por acetonitrilo:agua acidificada en proporciones 3:7 (MEI1c) y 7:3 v/v (MEI3d) (Figura 27 C y D). Los cromatogramas obtenidos muestran que el método MEI1c es el más resolutivo, ya que permitió la detección de más compuestos de la mezcla con una mejor resolución (Figura 27C). Los otros métodos ensayados no permitieron la identificación correcta de todos los polifenoles de la mezcla patrón.

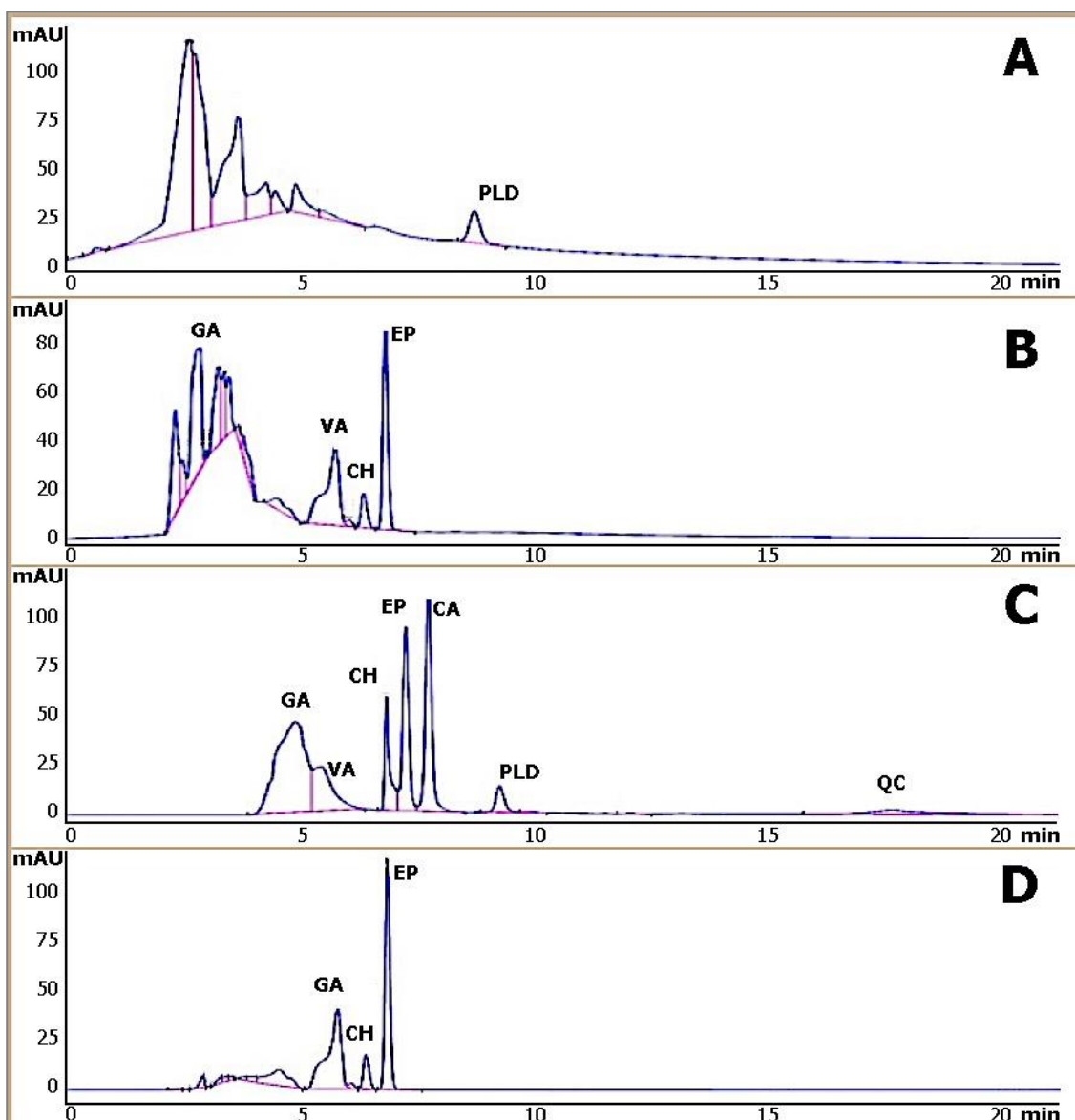


Figura 27. Cromatogramas HPLC-DAD a 210nm obtenidos con la mezcla patrón de polifenoles resueltos con el método de elución isocrático MEI1a(A), MEI1b(B), MEI1c (C) y MEI1d (D). Ácido gálico (GA), Hidrato de catequina (CH), epicatequina (EP), ácido cafeico (CA), ácido vanílico (VA), polidatina (PLD), quercetina (QC).

A la vista de estos resultados, se analizaron variantes a partir del método MEI1c. Lo primero que se probó fue incluir un alcohol en la fase móvil, metanol en el método MEI1e y etanol en el método MEI1f, de modo que esta quedaba compuesta por solvente A (agua-acético 99:1 v/v), solvente B (acetonitrilo) y solvente C (alcohol) en proporciones [69:16:15]. En estos dos métodos se aumentó ligeramente el caudal a 0,85ml/min y la temperatura se fijó a 25°C.

La elución con el método MEI1e (Figura 28A) mostró diferencias notables con respecto al método MEI1c y permitió detectar de manera separada y bien resuelta todos los polifenoles manteniendo la línea base, lo que facilita la identificación y cuantificación posterior. Con este método de elución el ácido gálico ha mejorado su resolución y los ácidos cafeico y vanílico se han resuelto completamente. Con el método de elución MEI1f también se consigue una buena separación de compuestos, pero no se mantiene la línea base, lo que dificulta los análisis posteriores (Figura 28B). Estos resultados indican que la inclusión de metanol en la fase móvil mejora la resolución cromatográfica de los polifenoles incluidos en la muestra patrón.

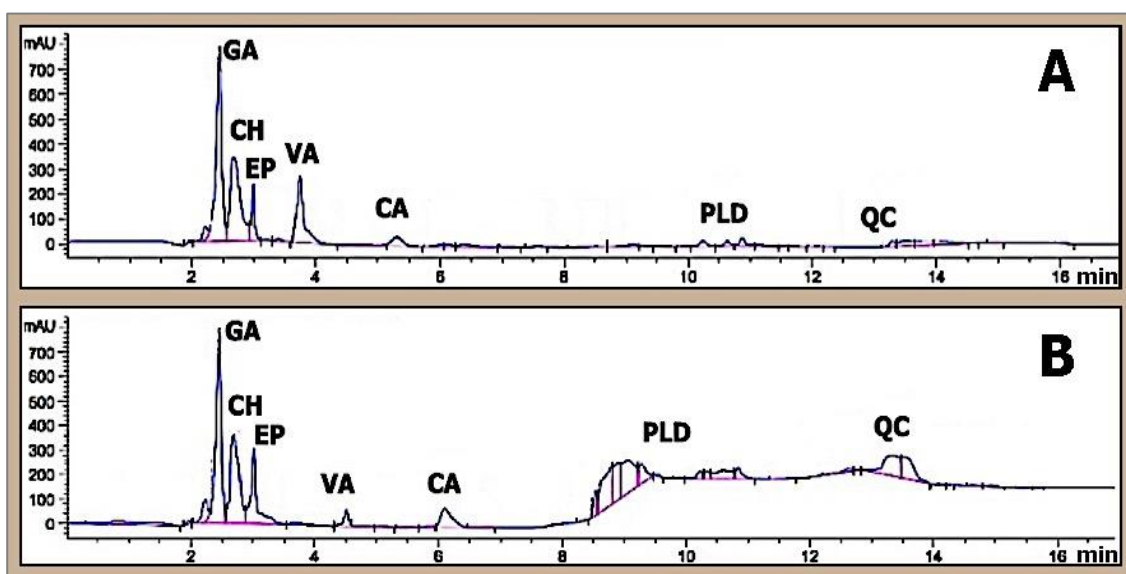


Figura 28. Cromatogramas HPLC-DAD a 210nm de la mezcla patrón de polifenoles resueltos con los métodos de elución isocráticos MEI1e (A), MEI1f (B). Ácido gálico (GA), Hidrato de catequina (CH), epicatequina (EP), ácido cafeico (CA), ácido vanílico (VA), polidatina (PLD), quercetina (QC).

También se ensayó el efecto del pH de la fase móvil en la elución de los polifenoles patrón. Se utilizó ácido acético (MEI2a), ácido fosfórico (MEI2b) y ácido fórmico (MEI3) al 0,1% con un flujo de la fase móvil de 0,65mL/min. Se observó que el método MEI3 permitía la mejor resolución de los polifenoles de la muestra (Figura 29C). El uso de ácido fosfórico (MEI2b) dio el peor resultado en la resolución de las moléculas. A partir de estos resultados se decidió utilizar ácido fórmico para acidificar la fase móvil, ya que además es un ácido que no interfiere en la ionización de los polifenoles cuando son analizados por espectrometría de masas.

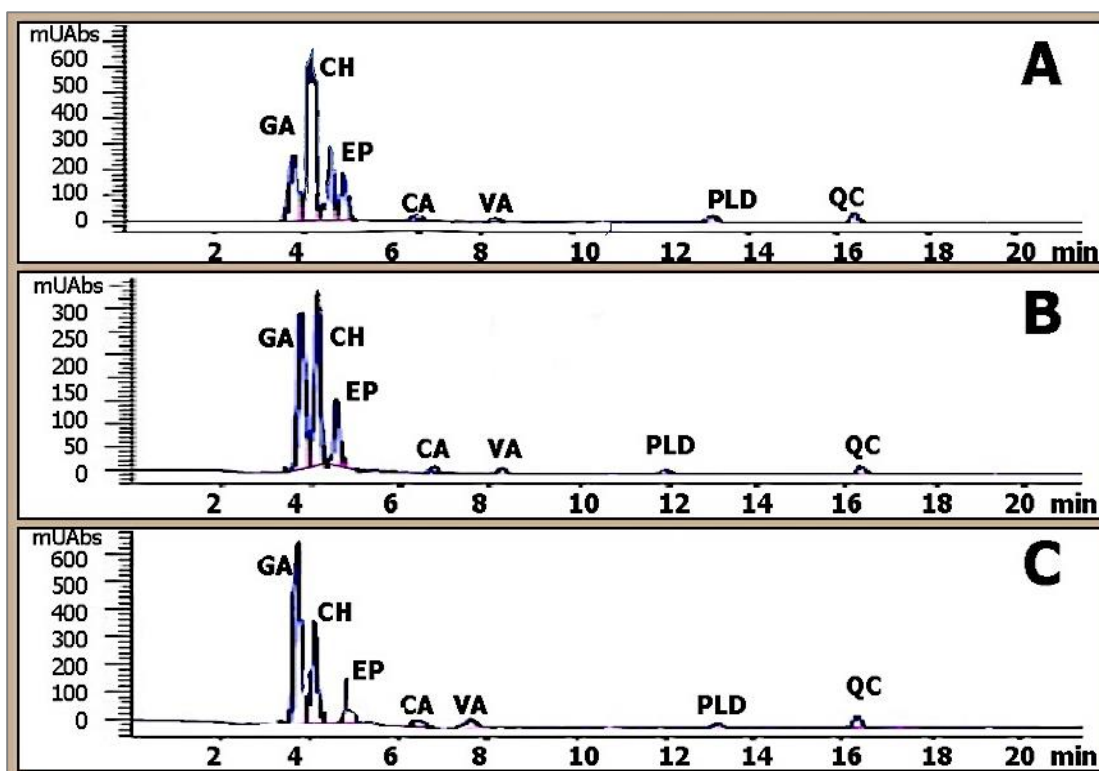


Figura 29. Cromatogramas HPLC-DAD a 210nm de la mezcla patrón de polifenoles resueltos con los métodos de elución isocráticos MEI2a (A), MEI2b (B) y MEI3 (C). Ácido gálico (GA), Hidrato de catequina (CH), epicatequina (EP), ácido cafeico (CA), ácido vanílico (VA), polidatina (PLD), quercetina (QC).

Estos experimentos con la muestra de patrones generaron resultados aceptables, pero no óptimos, ya que con estos métodos algunos polifenoles se solapaban parcialmente durante la elución. El método MEI3 fue el que se utilizó para el análisis de los polifenoles extraídos de las muestras de mosto con los diferentes métodos de extracción ensayados descritos en el apartado anterior (4.3). Sin embargo, se siguió trabajando en la puesta a punto de un método de elución que permitiera una óptima resolución de todos los polifenoles, ya que en la complejidad en polifenoles de los extractos de mosto es mucho mayor que la que presenta la muestra de patrones utilizada en estos experimentos.

4.4.2. Separación de polifenoles por HPLC con métodos de elución en gradiente.

Con el fin de optimizar la separación de los polifenoles de los extractos de mosto, se probaron diferentes métodos de elución en gradiente (Tabla 5, materiales y métodos). Además de cambiar las proporciones de los solventes durante la elución, se cambiaron los parámetros de caudal y tiempo de elución. Al igual que antes se trabajó con la mezcla control de 7 polifenoles disueltos en metanol a 15mg/L.

Se comenzó con el método de elución en gradiente MEG1 (Figura 30A), que creaba un gradiente de polaridad que pasaba del 30% al 70% de acetonitrilo a lo largo del tiempo de elución. En el método MEG2 se varió el gradiente de elución ligeramente, lo que permitió mejorar un poco la resolución de varios patrones (Figura 30B). Estos dos métodos si bien permitían una buena resolución de los polifenoles patrón, cuando se utilizaban para analizar las muestras de los extractos de los distintos mostos, los polifenoles presentes eluían demasiado juntos y no había una buena separación de los mismos (datos no mostrados), por ello se continuó analizando otros métodos. El objetivo era mejorar la resolución en la región más polar del cromatograma, donde se acumulaban un mayor número de polifenoles. En el método de elución MEG3, se varió el gradiente de los solventes de la fase móvil (Entre los minutos 12 y 25 se incrementó la concentración de acetonitrilo), el tiempo de elución a incrementó a 35 minutos y el caudal se estableció en 0,5mL/min (Figura 30C). Y en el método denominado MEG4 se inició la elución con un 100% de agua hasta reducirla al 20% antes de recuperar las condiciones iniciales; se ajustó el tiempo de elución a 45 minutos, manteniendo el caudal a 0,5mL/min(Figura 30D). Se puede observar que los patrones, tanto en el cromatograma utilizando el método MEG3 (Figura 30C) como utilizando el método de elución MEG4 (Figura 30D) se eluyen bien los polifenoles. No obstante, el cromatograma utilizando el método MEG4 (Figura 30D) permite una separación mayor de los compuestos, necesaria para el análisis de las muestras de mosto, como se describe a continuación.

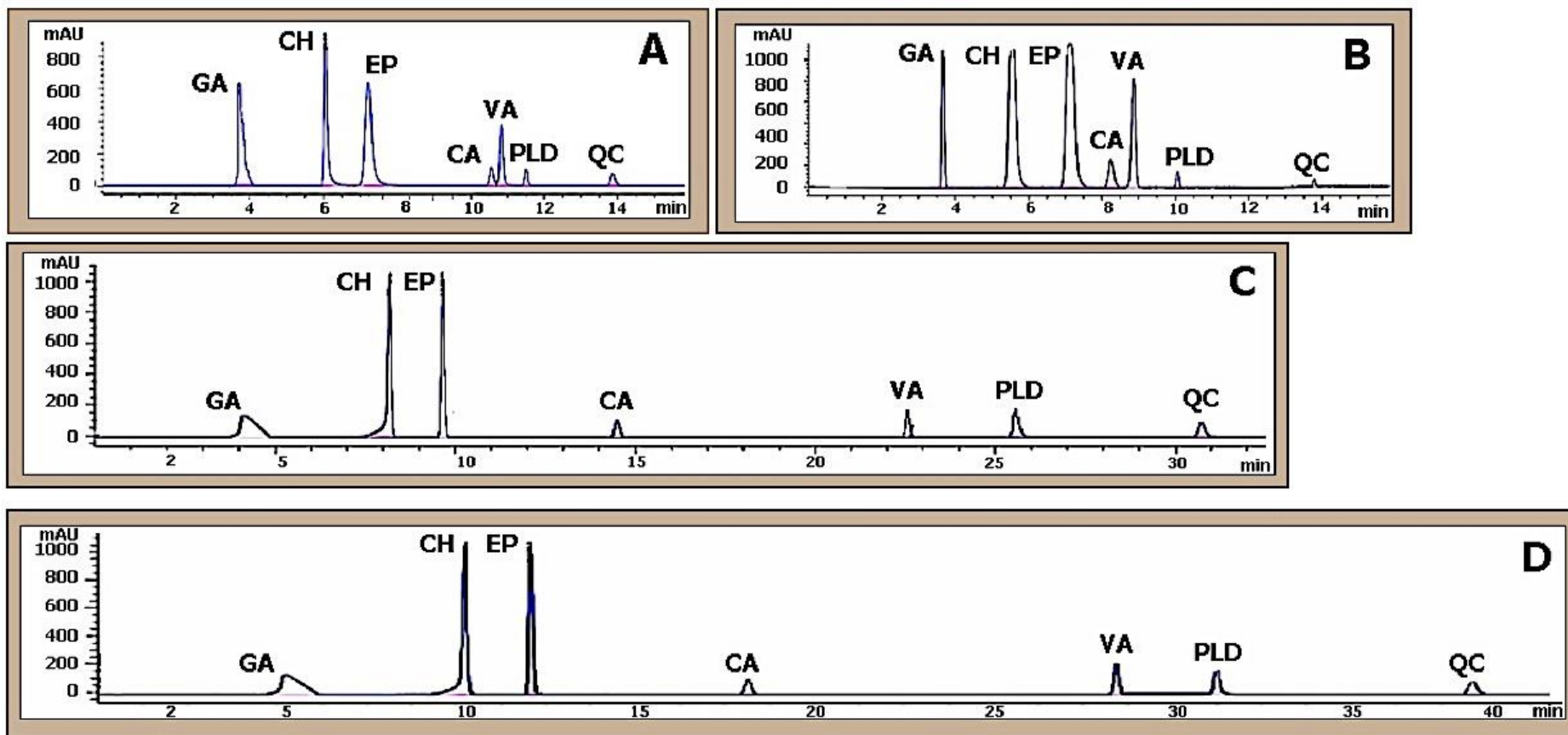


Figura 30. Cromatogramas HPLC-DAD a 210nm de la mezcla patrón de polifenoles obtenidos con los métodos de elución en gradiente MEG1 (A), MEG2 (B), MEG3 (C) y MEG4 (D) Por orden de elución: ácido gálico (GA), catequina (CH), epicatequina (EP), ácido cafeico (CA), ácido vanílico (VA), polidatina (PLD) y quercetina (QC).

El método de elución MEG4 permitió la mejor resolución de los polifenoles de la mezcla patrón y fue el método de elección para realizar el análisis de los extractos de polifenoles de los mostos. Primero se comparó el perfil de polifenoles en los extractos de mosto de las 5 variedades de uva estudiadas, pudiéndose apreciar diferentes perfiles en función del varietal (Figura 31). Se aprecia que la mayoría de los polifenoles de las muestras eluyen al inicio del cromatograma, lo que se explicaría por ser polifenoles de naturaleza polar extraídos con metanol. La diferencia en la intensidad de los picos de los diferentes extractos siendo Tempranillo en el que más intensidad presenta. Se seleccionó este método como el mejor para resolver todos los polifenoles de los extractos porque nos permitió eluir mayor número de compuestos de las muestras.

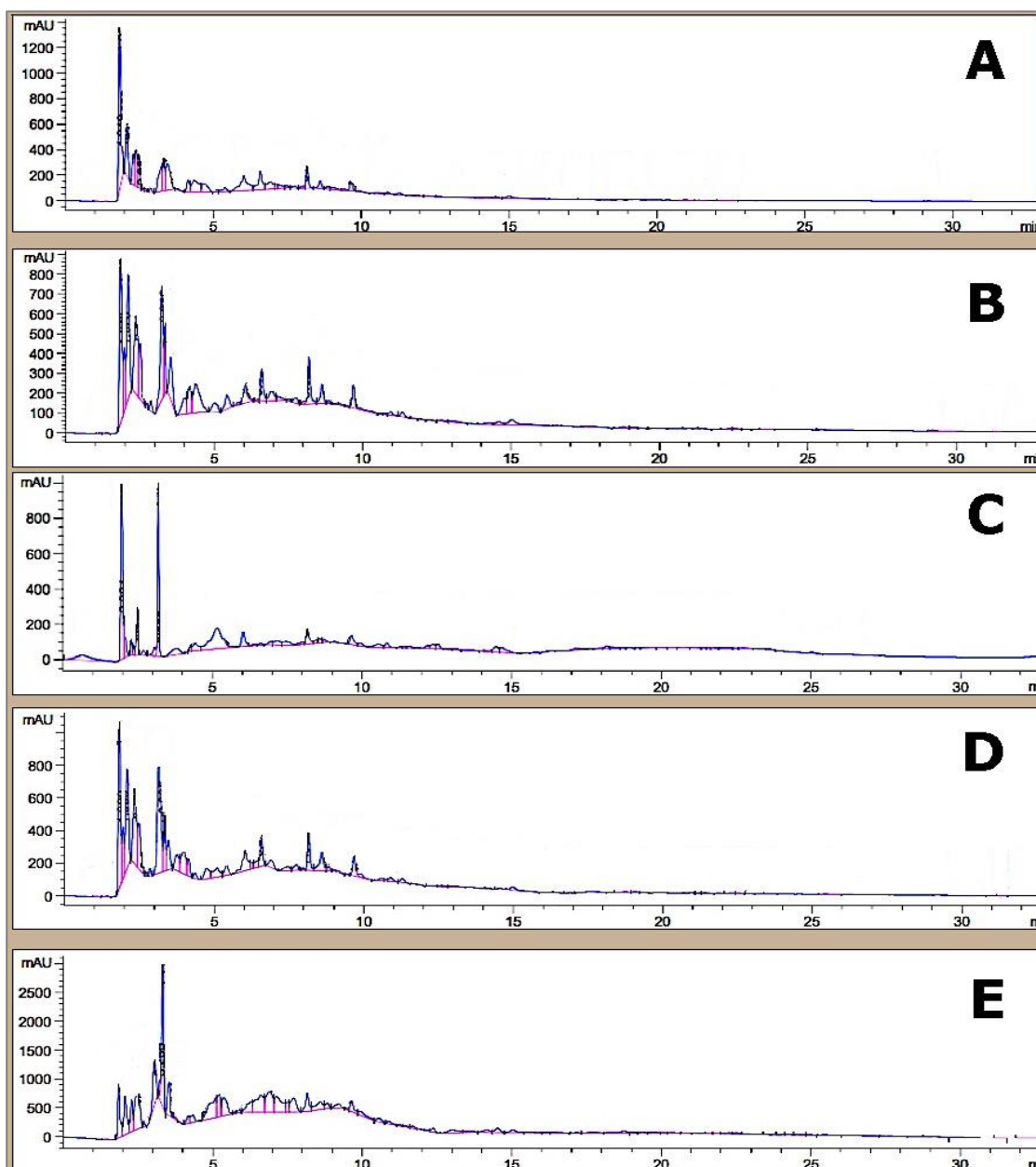


Figura 31. Cromatogramas HPLC-DAD a 210nm de los extractos de polifenoles de mosto Airén (A), Gewürztraminer (B), Sauvignon blanc (C), Verdejo (D) y Tempranillo (E), resueltos utilizando el método de elución MEG4.

También se analizaron los extractos de mosto Airén de las distintas etapas del proceso de concentración industrial utilizando el método de elución MEG4. Del mismo modo que antes, los cromatogramas obtenidos muestran que la mayoría de los polifenoles eluyen en los primeros 10 minutos del gradiente y se puede apreciar que en los extractos del mosto concentrado la intensidad de los picos detectados es bastante mayor que en la muestra inicial, lo que indica una mayor concentración de los mismos como es de esperar por el proceso de concentración (Figura 32).

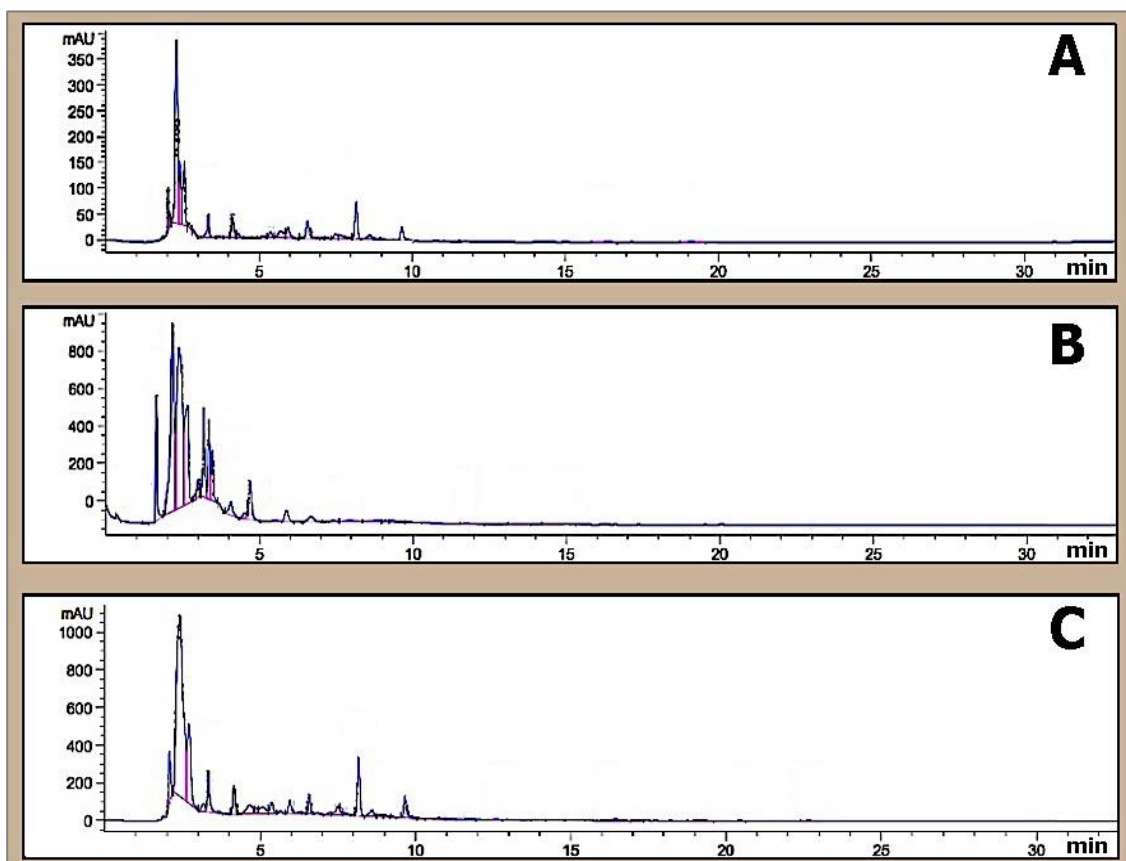


Figura 32. Cromatogramas HPLC-DAD a 210nm de los extractos de polifenoles de las distintas etapas del mosto concentrado normal Airén (A), Etapa inicial (B), Etapa media (C), Etapa final, resueltos utilizando el método de elución MEG4.

4.5. Análisis cuantitativo de los polifenoles del mosto mediante espectrometría de masas.

Una vez definidas las condiciones de HPLC que permiten una adecuada resolución de los polifenoles presentes en los extractos de mosto, el siguiente paso fue identificar y cuantificar estos compuestos mediante HPLC-MS. Para llevar a cabo el estudio, lo primero que se hizo fue generar una base de datos de polifenoles, con la que comparar los espectros de nuestras muestras y así poder identificar y cuantificar polifenoles concretos.

4.5.1. Creación de una base de datos para la identificación de polifenoles mediante HPLC-MS.

Para generar la base de datos de polifenoles de mosto con los parámetros que permitan su identificación mediante HPLC-MS, se realizó una búsqueda bibliográfica para identificar los polifenoles descritos más habituales en la uva. Se identificaron 122 polifenoles que podían estar presentes en el mosto, de ellos se seleccionaron las moléculas de tamaño molecular comprendido entre 50 y 500Da, para evitar incluir moléculas de gran complejidad, dímeros, sustituciones glucídicas, etc. (Tabla I Anexo). De estos 122 compuestos, se seleccionaron 56 polifenoles de los que se disponía de datos publicados con los parámetros necesarios para su identificación mediante MS (Tabla II Anexos)²¹⁴⁻²²⁸ y que podrían estar presentes en muestras de mosto. No obstante, para poder identificarlos con seguridad en nuestro equipo y condiciones de trabajo, era necesario estudiar el espectro de fragmentación real de los distintos polifenoles, distinguiendo los fragmentos más estables, tanto en modo de ionización positivo como negativo. De estos 56 compuestos finalmente se seleccionaron 23 para realizar el análisis por ser compuestos representantes de las familias de polifenoles habitualmente presentes en la uva y sus derivados, que además estaban accesibles comercialmente. Estos 23 compuestos seleccionados reunían las siguientes condiciones: ser polifenoles sin modificación química (principalmente glicosilación) y tener una señal analítica suficiente para poder ser cuantificados (Tabla 15).

Para la cuantificación de los polifenoles, se necesitó adaptar los voltajes de ionización en el equipo Qtrap4500 de Sciex, utilizando para el análisis la ionización por *electrospray* (ESI), tanto en el modo de ionización negativo como positivo. El trabajo de optimización

de los parámetros de ionización y fragmentación de los polifenoles, y su posterior cuantificación en las muestras de los extractos de mosto, fue realizado en colaboración y bajo la supervisión de la Dra María Posada Ayala, profesora de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad Francisco de Vitoria

En las Tabla 15 y 16 se muestran los polifenoles analizados con los parámetros de espectrometría necesarios para su identificación y el modo de ionización en el que se ha realizado el análisis. Para un compuesto podría haber varios fragmentos seleccionables, pero solamente se ha mostrado aquel que mejores resultados de cuantificación ha proporcionado. El proceso de selección de una molécula, en el interior del equipo, es un recorrido secuencial que tiene una duración de milisegundos por cada molécula analizada. Comienza en el primer cuadrupolo (Q_1), donde tiene lugar la selección de las moléculas en función de su tamaño (peso molecular) y la carga adquirida por causa de la ionización, estableciendo unos valores concretos de selección, debido a la relación carga/masa resultante. A continuación, en el segundo cuadrupolo (Q_2) tiene lugar la fragmentación de la molécula por efecto del voltaje de colisión y estabilización establecido. Los fragmentos resultantes, se seleccionan en el tercer cuadrupolo (Q_3) de manera similar al modo empleado en el primer cuadrupolo, por la relación carga masa. Los fragmentos se van acumulando en la trampa iónica, aumentando así la intensidad de señal (cps) (cuentas por segundo-iones que llegan al detector), para su posterior identificación. La cuantificación de uno de los fragmentos, por analogía sirve para la cuantificación del polifenol del cual proviene dicho fragmento.

Tabla 15. Parámetros para analizar los 23 polifenoles seleccionados mediante espectrometría de masas. Q₁, relación carga/masa (Da) del polifenol que se desea analizar. Q₃, indica el fragmento mayoritario y estable. El tiempo en milisegundos, hace referencia al tiempo de análisis. CE es la energía de colisión que ocurre en el Q₂ (celda de colisión). DP (*declustering potential*), potencial de entrada en fuente y CXP (*collision cell exit potential*), hacen referencia a parámetros de energía de estabilización del equipo para seleccionar los tamaños adecuados y focalizarlos al Q₃. EP (*entrance potential*), es el potencial en Q₀; en Q₁ fue de 10 voltios para todas las muestras.

Modo de ionización negativo							
Nº	Nombre del compuesto	Q1 (Da)	Q3 (Da)	Tiempo (msec)	DP (voltios)	CE (voltios)	CXP (voltios)
1	Ácido cafeico	178,9	135	5	-50	-22	-9
2	Ácido cumárico	162,9	93	5	-30	-30	-5
3	Ácido dihidroxibenzoico	152,9	109	5	-75	-20	-7
4	Ácido gálico	168,9	124,9	5	-110	-20	-7
5	Ácido protocatecuico	152,9	90,9	50	-75	-32	-13
6	Ácido salicílico	136,9	93,1	50	-15	-22	-5
7	Ácido vanílico	167,1	152	50	-50	-20	-10
8	Esculetina	175,9	133	50	-65,5	-29	12
9	Isorhamnetina	315	300	50	-225	-28	-15
10	Polidatina	389,03	227,01	50	-110	-18	-9
11	Quercetina	301,1	178,9	50	-50	-21,15	-10
12	Resveratrol	226,98	142,89	50	-95	-30	-9
13	Rutina	609	299,9	50	-230	-70	-9
14	Viniferina	453	410,9	50	-45	-36,5	-9
Modo de ionización positivo							
Nº	Nombre del compuesto	Q1 (Da)	Q3 (Da)	Tiempo (msec)	DP (voltios)	CE (voltios)	CXP (voltios)
15	Ácido clorogénico	355,1	163	50	46	21	10
16	Ácido elágico	303,2	285,2	50	100	27	5
17	Ácido ferúlico	195	167	50	50	11,13	10
18	Apigenina	271	253,1	50	100	14	10
19	Catequina	291	139	50	16	21	10
20	Epicatequina	291	138,9	50	36	21	8
21	Kaempferol	285	153	50	111	43	10
22	Luteolina	285	153	50	100	89	10
23	Siringaldehído	183	123,1	50	41	17	8

4.5.2. Selección de polifenoles y validación del método de análisis.

Una vez realizada la optimización para la identificación de los polifenoles comerciales, se analizaron las muestras de los extractos de mosto para determinar la presencia y cantidad de los 23 compuestos seleccionados. De los 23 compuestos estudiados, solo se han podido identificar y cuantificar 16 polifenoles, los 7 restantes no se pudieron identificar (Tabla 16).

Tabla 16. Parámetros para analizar los polifenoles seleccionados mediante espectrometría de masas. Q₁, relación carga/masa (Da) del polifenol que se desea analizar. Q₃, indica el fragmento mayoritario y estable. El tiempo en milisegundos, hace referencia al tiempo de análisis. CE es la energía de colisión que ocurre en el Q₂ (celda de colisión). DP (*declustering potential*), potencial de entrada en fuente y CXP (*collision cell exit potential*), hacen referencia a parámetros de energía de estabilización del equipo para seleccionar los tamaños adecuados y focalizarlos al Q₃. EP (*entrance potential*), es el potencial en Q₀; en Q₁ fue de 10 voltios para todas las muestras.

Modo de ionización negativo							
Nº	Nombre del compuesto	Q1 (Da)	Q3 (Da)	Tiempo (msec)	DP (voltios)	CE (voltios)	CXP (voltios)
1	Ácido cafeico	178,9	135	5	-50	-22	-9
2	Ácido cumárico	162,9	93	5	-30	-30	-5
3	Ácido dihidroxibenzoico	152,9	109	5	-75	-20	-7
4	Ácido gálico	168,9	124,9	5	-110	-20	-7
5	Ácido protocatecuico	152,9	90,9	50	-75	-32	-13
6	Ácido salicílico	136,9	93,1	50	-15	-22	-5
7	Ácido vanílico	167,1	152	50	-50	-20	-10
8	Esculetina	175,9	133	50	-65,5	-29	12
9	Isorhamnetina	315	300	50	-225	-28	-15
10	Polidatina	389,03	227,01	50	-110	-18	-9
11	Quercetina	301,1	178,9	50	-50	-21,15	-10
12	Resveratrol	226,98	142,89	50	-95	-30	-9
Modo de ionización positivo							
Nº	Nombre del compuesto	Q1 (Da)	Q3 (Da)	Tiempo (msec)	DP (voltios)	CE (voltios)	CXP (voltios)
13	Ácido clorogénico	355,1	163	50	46	21	10
14	Ácido ferúlico	195	167	50	50	11,13	10
15	Catequina	291	139	50	16	21	10
16	Epicatequina	291	138,9	50	36	21	8

La cuantificación de los polifenoles se hizo a partir de los fragmentos detectados en las muestras que tenían el mismo par tiempo de retención-relación masa/carga (t_r (m/z)) y espectro de fragmentación que los patrones. Los compuestos con diferente tiempo de retención, pero el mismo espectro de fragmentación, corresponden con isómeros de los polifenoles estudiados. Aunque la relación masa-carga es la misma, difieren en la posición interna de ciertos átomos con respecto al analito patrón. Esto es común en los flavonoides, que comparten un esqueleto de 3 anillos y el mismo número de átomos, ordenados espacialmente de manera distinta, o en la familia de los estilbenos, con la estructura de doble anillo fenólico unidos por una cadena de 3 carbonos con un doble enlace, como las diferentes formas *cis* y *trans*. En este estudio, no se contempló la cuantificación de isómeros.

Para la identificación y cuantificación de los 16 polifenoles seleccionados se hicieron rectas de calibrado en el espectrómetro de masas analizando muestras de cada uno de los polifenoles en un intervalo de concentración entre $1\mu\text{g/L}$ y 10mg/L . Estos experimentos se hicieron por triplicado incluyendo ácido acetil salicílico ($50\mu\text{g/L}$) como control interno. Además, se calculó el coeficiente de correlación (r_2), el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) para cada uno de los polifenoles (Tabla 17)

Tabla 17. Datos de calibración de los polifenoles seleccionados para su cuantificación y familia a la que pertenecen. Se incluye el coeficiente de correlación (r²), el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) para cada uno de los polifenoles.

Familia	Polifenol	Modo Ionización	Tiempo retención	Ecuación de la recta de regresión	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	r ²
Ácidos hidroxicinámicos	Ácido cafeico	-	19,26	$y = 244,62x - 604,68$	0,228	0,759	0,994
	Ácido clorogénico	+	16,76	$y = 334,98x - 917,07$	0,022	0,075	0,996
	Ácido cumárico	-	21,83	$y = 5,1843x - 14,455$	0,736	2,452	0,995
	Ácido ferúlico	+	37,1	$y = 6,5271x - 21,683$	0,819	2,731	0,998
Hidroxicumarinas	Esculetina	-	19,83	$y = 17,313x - 37,133$	0,288	0,961	0,999
	Ácido protocatecuico	-	16,77	$y = 1,332x - 4,3793$	0,360	1,201	0,997
	Ácido salicílico	-	28,33	$y = 353,7x - 895,34$	0,053	0,175	0,992
Ácidos hidroxibenzoicos	Ácido dihidroxibenzoico	-	16,78	$y = 59,618x - 200,87$	0,848	2,826	0,998
	Ácido gálico	-	5,25	$y = 20,642x - 50,802$	0,895	2,983	0,989
	Ácido vanílico	-	29,83	$y = 4,6498x - 18,158$	0,421	1,403	0,992
	Isorhamnetina	-	31,84	$y = 5,2125x - 13,553$	1,128	3,760	0,997
Flavonoles	Quercetina	-	37,06	$y = 1,2944x - 4,1921$	1,221	4,070	0,998
	Polidatina	-	33,12	$y = 39,529x - 89,901$	0,715	2,383	0,997
Estilbenos	Resveratrol	-	26,35	$y = 15,725x - 55,016$	0,388	1,295	0,991
	Catequina	+	13,3	$y = 24,117x - 44,19$	0,355	1,184	0,999
Flavanoles	Epicatequina	+	14,2	$y = 18,621x - 37,673$	0,877	2,925	0,997

4.5.3. Detección y cuantificación de los polifenoles seleccionados en extractos de mosto de diferentes variedades mediante HPLC-MS.

Una vez establecidas y validadas las condiciones para la identificación de polifenoles con el equipo HPLC-MS Agilent1260-QTrap4500, se inició el estudio con los extractos de mosto de los cinco variedades. A partir de los datos obtenidos en el espectrómetro de masas, se extraen los valores numéricos para cada uno de los fragmentos identificados en los espectros obtenidos, seleccionando los compuestos en base a los tiempos de retención previamente calculados con los patrones estudiados. Los espectros de masas de los extractos de mosto fresco Airén en los modos de ionización positivo y negativo se muestran en la Figura 33. Los espectros muestran una mayor diversidad de tamaños y abundancia de fragmentos de polifenoles en el modo de ionización negativo (Figura 33B) que en el positivo (Figura 33A). Los espectros de los extractos del resto de variedades se muestran en los Anexos en las figuras I, II, III y IV. En todos los casos se recoge el espectro comprendido entre 50 y 500 Da, en los dos modos de ionización.

Los datos de cuantificación de los polifenoles estudiados se presentan agrupados por familias, con el fin de facilitar el seguimiento y la comparación en las distintas muestras. Para determinar si las diferencias de concentración de los polifenoles en las muestras de variedades son significativas se ha realizado un análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de significación de 0,01 ($p\ value < 0,01$). Los resultados de la ANOVA indicaban que había diferencias estadísticamente significativas prácticamente en todos los casos, confirmadas con el post hoc de Tukey, aunque las diferencias reales de concentración de un polifenol fuesen muy pequeñas. Esto se podría deber a la alta sensibilidad y reproducibilidad de la espectrofotometría de masas y por ello se decidió analizar la relevancia de las diferencias los test de comparación de medias utilizando el criterio de "fold of change", tomando como referencia la concentración de cada compuesto en el extracto Airén (apartado 3.1.3).

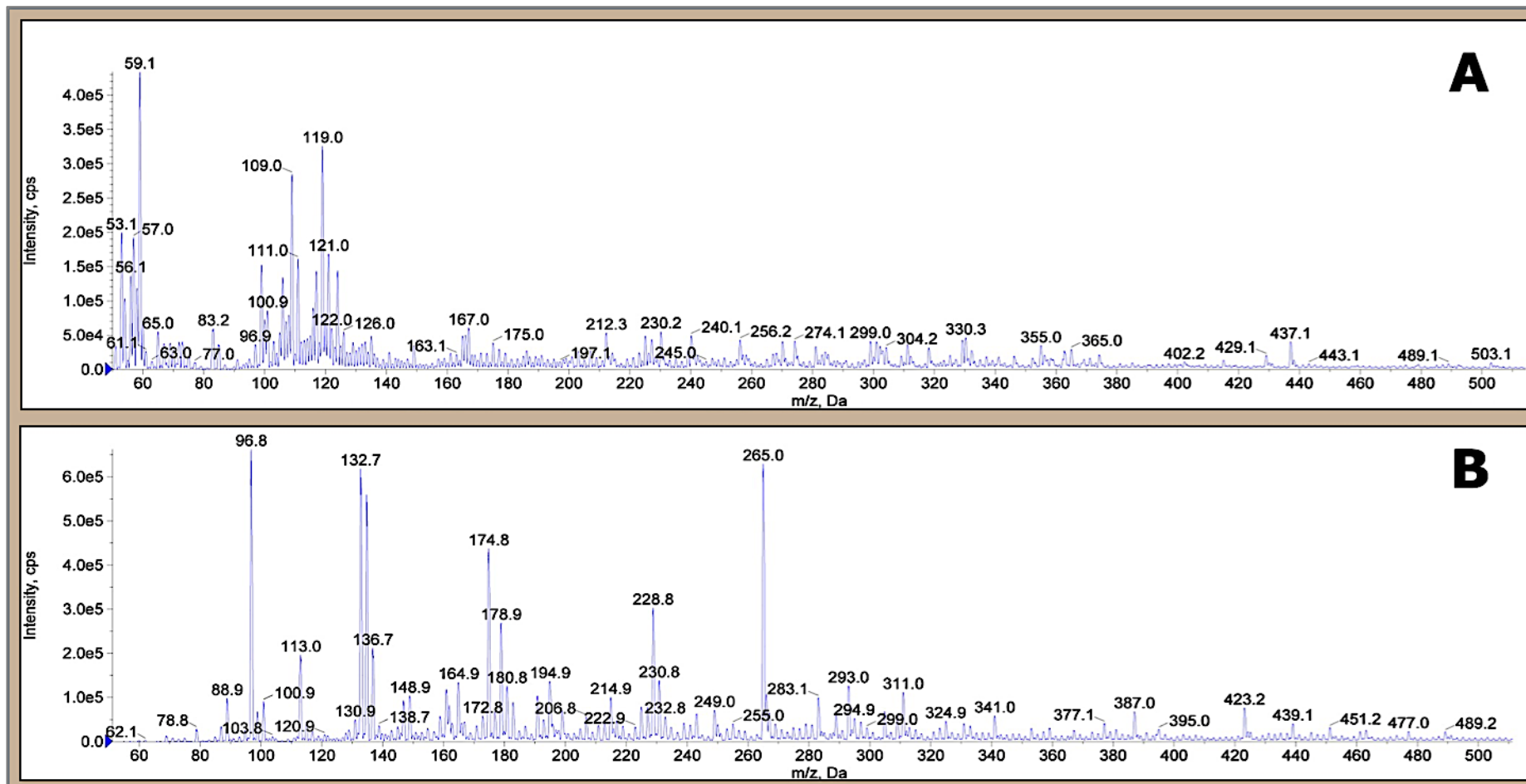


Figura 33. Espectros de masas de los fragmentos identificados en los extractos de mosto fresco Airén obtenidos en el modo de ionización positivo (A) y negativo (B). Intensidad cuantificada en cps (cuentas por segundo).

De la familia de los ácidos hidroxicinámicos, que incluye los ácidos cafeico, clorogénico y cumárico (Tabla 18, Figura 34), solo los extractos de mosto Airén (**amarillo**) y Verdejo (**verde**) contienen los tres ácidos estudiados, siendo el ácido cumárico únicamente identificado en estos dos varietales. La concentración de ácido cafeico en el extracto Airén (**amarillo**) es muy similar a la concentración detectada en Tempranillo (**morado**) y ligeramente superior que en el resto de variedades blancas, no habiéndose detectado en el extracto Sauvignon blanc (**azul**). El ácido clorogénico es el único que está presente en los cinco extractos, siendo su concentración un 5,5% superior en el extracto de la variedad tinta Tempranillo (**morado**) que en el extracto de la variedad Airén (**amarillo**). El análisis ANOVA indica que todas las diferencias son estadísticamente significativas, excepto en el caso del ácido clorogénico entre Airén con Gewürztraminer ($p=0,0126$), que se ha marcado en la figura con la letra a y Verdejo ($p=0,7823$), que se ha marcado en la figura con la letra b; y es en el mosto Tempranillo (**morado**) donde más cantidad se ha detectado de este ácido. Sin embargo, las diferencias de concentración son mínimas, de ahí que para determinar la relevancia de los resultados obtenidos se ha calculado el cociente de "fold of change". Como se muestra en la tabla 18, las diferencias de concentración detectadas en los ácidos hidroxicinámicos analizados en los extractos de mosto de los diferentes varietales no tienen relevancia funcional. En este caso lo único a destacar es la ausencia de ácido cumárico en las muestras de las variedades Gewürztraminer, Sauvignon blanc y Tempranillo.

Tabla 18. Medidas de concentración y comparación estadística de los tres ácidos hidroxicinámicos estudiados en los extractos de los variedades de mosto (mg/L±desviación estándar). Todas las comparaciones son estadísticamente significativas entre Airén y el resto de variedades; test ANOVA y post-hoc Tukey ($p < 0,01$) excepto: Ácido clorogénico (a) Airén-Gewürztraminer, $p = 0,0126$ y (b) Airén-Verdejo, $p = 0,7823$. Nd = no determinado. Cálculo de la relevancia utilizando el criterio de "fold of change".

Polifenol	Varietal	Concentración [mg/L] ± DS	Fold of change	Relevancia
Ácido cafeico	Airén	2,544±0,002	0	0
	Gewürztraminer	2,5067±0,0003	0,985	1
	Sauvignon blanc	nd	0	0
	Verdejo	2,4965±0,0002	0,981	1
	Tempranillo	2,559±0,002	1,006	1
Ácido clorogénico	Airén	2,791±0,002	0	0
	Gewürztraminer	2,805±0,003 _a	0	0
	Sauvignon blanc	2,765±0,001	0,991	1
	Verdejo	2,786±0,002 _b	0	0
	Tempranillo	2,94±0,02	1,055	1
Ácido cumárico	Airén	2,854±0,001	0	0
	Gewürztraminer	nd	0	0
	Sauvignon blanc	nd	0	0
	Verdejo	2,927±0,009	1,026	1
	Tempranillo	nd	0	0

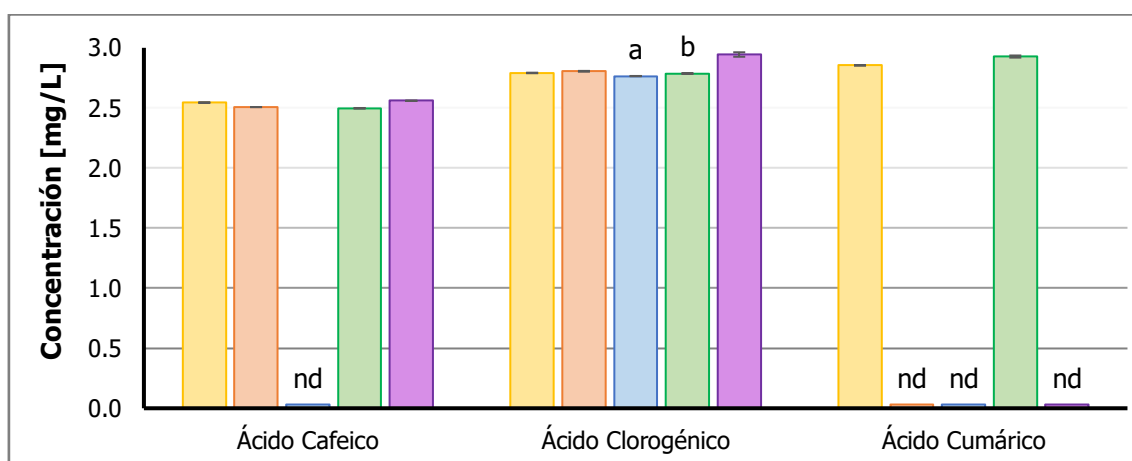


Figura 34. Representación gráfica de las concentraciones de ácidos hidroxicinámicos en los extractos de mosto. Airén (■) Gewürztraminer (■), Sauvignon blanc (■), Verdejo (■), Tempranillo (■). Las letras a y b indican que no existe diferencia estadísticamente significativa con la variedad Airén.

De la familia de los ácidos hidroxibenzoicos, también llamados hidroxibenzoatos, se han estudiado los ácidos dihidroxibenzoico, gálico, protocatecuico, salicílico y vanílico (Tabla 19, Figura 35). Las concentraciones detectadas de todos estos compuestos son muy similares en los extractos de todos los mostos a excepción del ácido gálico. La mayor cantidad de ácido gálico se detecta en las variedades Gewürztraminer (**naranja**) y Verdejo (**verde**), siendo su concentración un 7,9% y un 9% superior a la detectada en Airén (**amarillo**), respectivamente. En Sauvignon blanc (**azul**), la concentración de ácido gálico es un 9,8% inferior a la detectada en Airén (**amarillo**), mientras que la variedad tinta Tempranillo (**morado**) presenta la misma concentración que Airén (**amarillo**) ($2,81\text{mg/L}\pm 0,01$). El ácido vanílico es el que está en mayor concentración en cada uno de los varietales, seguido del ácido dihidroxibenzoico y el ácido. El ácido salicílico es el que se encuentra en menor concentración en todas las muestras analizadas.

El análisis de varianza ANOVA marca casi todas las diferencias de concentración como estadísticamente significativas a excepción de las registradas para los ácidos dihidroxibenzoico ($p=0,624$), que se ha marcado en la figura con la letra a y gálico ($p=0,998$), que se ha marcado en la figura con la letra b en el extracto Tempranillo (**morado**) y el ácido salicílico en Verdejo (**verde**) ($p=0,0781$), que se ha marcado en la figura con la letra c. No obstante, al comparar el valor de "fold of change" obtenido en todos los casos, no se aprecia ningún valor que indique una diferencia de concentración relevante en ninguno de los ácidos de esta familia.

Tabla 19. Medidas de concentración y comparación estadística de los cinco ácidos hidroxibenzoicos estudiados en los extractos de los varietales de mosto (mg/L±desviación estándar). Todas las comparaciones son estadísticamente significativas entre Airén frente al resto de varietales; test ANOVA y post-hoc, Tukey ($p < 0,01$) excepto: Ácido dihidroxibenzoico: (a) Airén-Tempranillo, $p = 0,624$. Ácido gálico: (b) Airén-Tempranillo, $p = 0,998$. Ácido salicílico: (c) Airén-Verdejo, $p = 0,0781$. Cálculo de la relevancia utilizando el criterio de "fold of change".

Polifenol	Varietal	Concentración [mg/L] ± DS	Fold of change	Relevancia
Ácido dihidroxibenzoico	Airén	3,422±0,004	0	0
	Gewürztraminer	3,480±0,002	1,017	1
	Sauvignon blanc	3,404±0,001	0,995	1
	Verdejo	3,4114±0,0003	0,997	1
	Tempranillo	3,423±0,002 _a	0	0
Ácido gálico	Airén	2,81±0,01	0	0
	Gewürztraminer	3,05±0,04	1,082	1
	Sauvignon blanc	2,559±0,002	0,909	1
	Verdejo	3,065±0,009	1,089	1
	Tempranillo	2,81±0,03 _b	0	0
Ácido protocatecuico	Airén	3,337±0,002	0	0
	Gewürztraminer	3,338±0,003	1,000	1
	Sauvignon blanc	3,324±0,001	0,996	1
	Verdejo	3,333±0,002	0,999	1
	Tempranillo	3,333±0,003	0,999	1
Ácido salicílico	Airén	2,5414±0,0001	0	0
	Gewürztraminer	2,5621±0,0003	1,008	1
	Sauvignon blanc	2,5502±0,0001	1,003	1
	Verdejo	2,5412±0,0001 _c	0	0
	Tempranillo	2,5397±0,0001	0,999	1
Ácido vanílico	Airén	4,024±0,003	0	0
	Gewürztraminer	3,951±0,005	0,982	1
	Sauvignon blanc	3,9222±0,0008	0,975	1
	Verdejo	3,9323±0,0005	0,977	1
	Tempranillo	3,943±0,004	0,98	1

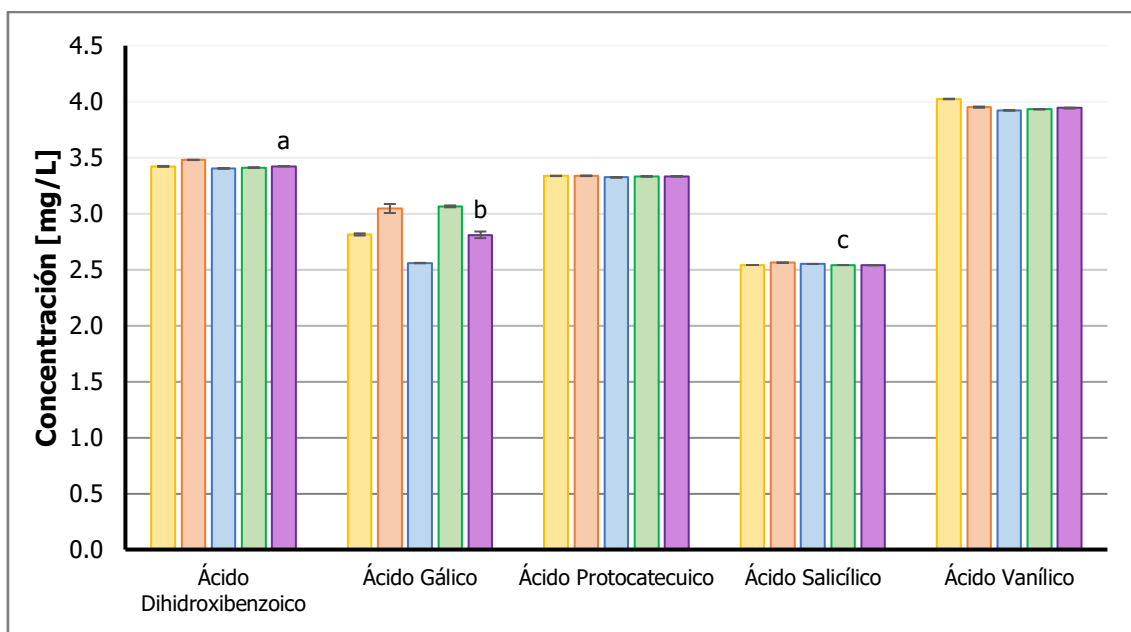


Figura 35. Representación gráfica de las concentraciones de ácidos hidroxibenzoicos en los extractos de mosto. Airén (■) Gewürztraminer (■), Sauvignon blanc (■), Verdejo (■), Tempranillo (■). Las letras a, b y c indican que no existe diferencia estadísticamente significativa con la variedad Airén.

En la familia de los estilbenos, se aprecia de media un 13,4% más de resveratrol que de polidatina en los varietales en los cuales se detecta, excepto en el extracto de Sauvignon blanc (azul), que no se detecta el resveratrol (Tabla 20, Figura 36). Para ambos polifenoles, la mayor concentración se detecta en la variedad Airén (amarillo), si bien el valor del "fold of change" indica que las diferencias estadísticamente significativas que marca la ANOVA no tienen relevancia funcional.

Tabla 20. Medidas de concentración y comparación estadística de los dos estilbenos estudiados en los extractos de varietales de mosto (mg/L±desviación estándar). Todas las comparaciones son estadísticamente significativas entre Airén frente al resto de varietales; test ANOVA y post-hoc Tukey ($p < 0,01$). nd = no determinado. Cálculo de la relevancia utilizando el criterio de "fold of change".

Polifenol	Varietal	Concentración [mg/L] ± DS	Fold of change	Relevancia
Polidatina	Airén	3,135±0,003	0	0
	Gewürztraminer	3,0849±0,0002	0,984	1
	Sauvignon blanc	3,06735±0,00002	0,978	1
	Verdejo	3,0837±0,0002	0,984	1
	Tempranillo	3,0989±0,0007	0,988	1
Resveratrol	Airén	3,536±0,002	0	0
	Gewürztraminer	3,512±0,001	0,993	1
	Sauvignon blanc	nd	0	0
	Verdejo	3,511±0,002	0,993	1
	Tempranillo	3,509±0,0003	0,992	1

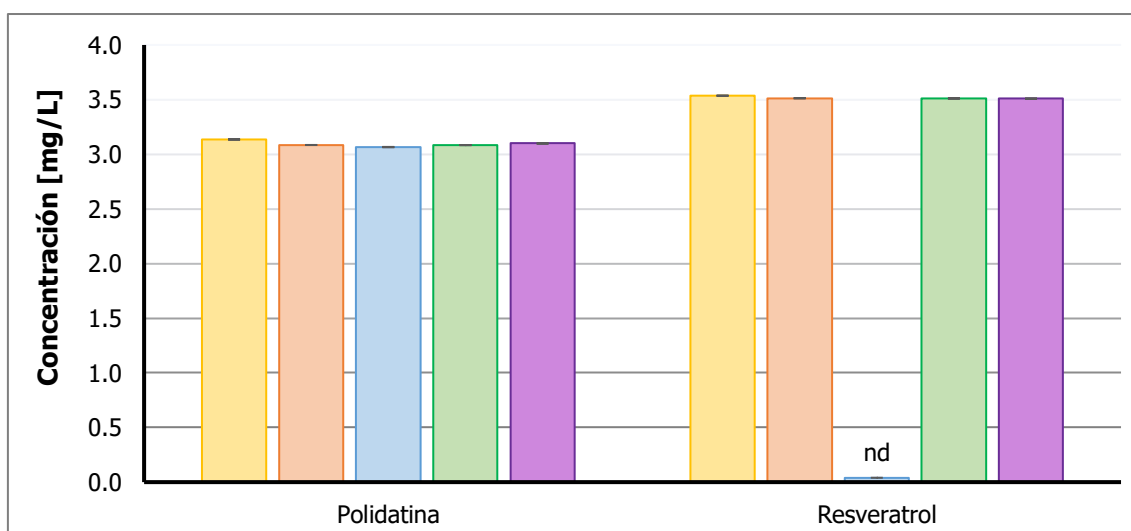


Figura 36. Representación gráfica de las concentraciones de estilbenos en los extractos de mosto. Airén (■) Gewürztraminer (■), Sauvignon blanc (■), Verdejo (■), Tempranillo (■).

Los resultados obtenidos con los flavonoides estudiados (catequina, epicatequina, isorhamnetina y quercetina) son los que han permitido detectar diferencias entre varietales. Las concentraciones detectadas de catequina y quercetina destacan claramente por encima del resto de polifenoles analizados, (Tabla 21, Figura 37). La concentración de catequina en el extracto Airén (**amarillo**) es un 20% superior a la detectada en Gewürztraminer (**naranja**), que es el segundo varietal con mayor abundancia, y triplica la concentración detectada en Sauvignon blanc (**azul**). Además, se la cantidad de catequina en Airén es un 43% superior a la detectada en el extracto Tempranillo.

En cuanto a la quercetina, las muestras que presentan la mayor cantidad son Airén (**amarillo**) y Gewürztraminer (**naranja**), con una diferencia entre ellas del 3,33% ($p=0,0264$), que se ha marcado en la figura con la letra a. Sin embargo, el extracto Airén presenta un 26% más de quercetina que el extracto de Verdejo (**verde**) y un 40% más que los extractos de Tempranillo (**morado**) y Sauvignon blanc (**azul**). La concentración detectada de isorhamnetina es muy similar en todos los extractos a excepción de Sauvignon blanc (**azul**), donde no se ha detectado. La epicatequina está presente en los cinco varietales, siendo Gewürztraminer (**naranja**) el varietal que presenta la mayor cantidad, un 16,8% superior a Airén (**amarillo**). De manera global, se puede apreciar que la variedad que presenta la menor concentración de los flavonoides estudiados es Sauvignon blanc (**azul**) y las variedades con mayor contenido en estos polifenoles serían Airén (**amarillo**) y Gewürztraminer (**naranja**).

El resultado de la ANOVA indica que las diferencias de concentración de todos los compuestos en relación con las detectadas en Airén son estadísticamente significativas, excepto en el caso de la quercetina entre Airén (**amarillo**) y Gewürztraminer (**naranja**). En este caso muchas de estas diferencias además de ser estadísticamente significativas también muestran relevancia funcional según criterio de "*fold of change*" como se puede ver en la tabla 21. Hay que destacar la elevada concentración de catequina detectada en el mosto Airén (**amarillo**) con diferencias de relevancia media y alta con el resto de varietales según el criterio de "*fold of change*" utilizado. También la quercetina muestra diferencias con Sauvignon blanc (**azul**) y Tempranillo (**morado**) de relevancia funcional media en base a este criterio. Los otros dos polifenoles de esta familia, epicatequina e isorhamnetina, muestran diferencias menos relevantes, pero en comparación al resto de polifenoles analizados merece la pena destacarlo.

Estos datos permiten afirmar que los extractos de mosto Airén (**amarillo**) y Gewürztraminer (**naranja**) son más ricos en los flavonoides analizados que los de Sauvignon blanc (**azul**), Verdejo (**verde**) y Tempranillo (**morado**), con diferencias de concentración estadísticamente significativas y con relevancia funcional.

Tabla 21. Medidas de concentración y comparación estadística de los cuatro flavonoides estudiados en los extractos de variedades de mosto (mg/L±desviación estándar). Todas las comparaciones son estadísticamente significativas entre Airén frente al resto de variedades; test ANOVA y post-hoc, Tukey ($p < 0,01$) excepto quercetina: (a) Airén-Gewürztraminer, $p = 0,0264$. nd = no determinado. Cálculo de la relevancia utilizando el criterio de "fold of change".

Polifenol	Varietal	Concentración [mg/L] ± DS	Fold of change	Relevancia
Catequina	Airén	6,3±0,1	0	0
	Gewürztraminer	4,2±0,4	0,664	3
	Sauvignon blanc	1,910±0,003	0,301	4
	Verdejo	3,05±0,02	0,482	3
	Tempranillo	3,6±0,2	0,564	3
Epicatequina	Airén	2,772±0,004	0	0
	Gewürztraminer	3,33±0,02	1,2	2
	Sauvignon blanc	2,02796±0,00003	0,731	2
	Verdejo	2,197±0,005	0,792	2
	Tempranillo	2,48±0,04	0,893	1
Isorhamnetina	Airén	2,6054±0,0003	0	0
	Gewürztraminer	2,6137±0,0006	1,003	1
	Sauvignon blanc	nd	0	0
	Verdejo	2,6029±0,0002	0,999	1
	Tempranillo	2,6042±0,0007	1	1
Quercetina	Airén	5,8±0,2	0	0
	Gewürztraminer	6,00±0,05 ^a	1,027	0
	Sauvignon blanc	3,51±0,01	0,6	3
	Verdejo	4,37±0,02	0,747	2
	Tempranillo	3,60±0,01	0,615	3

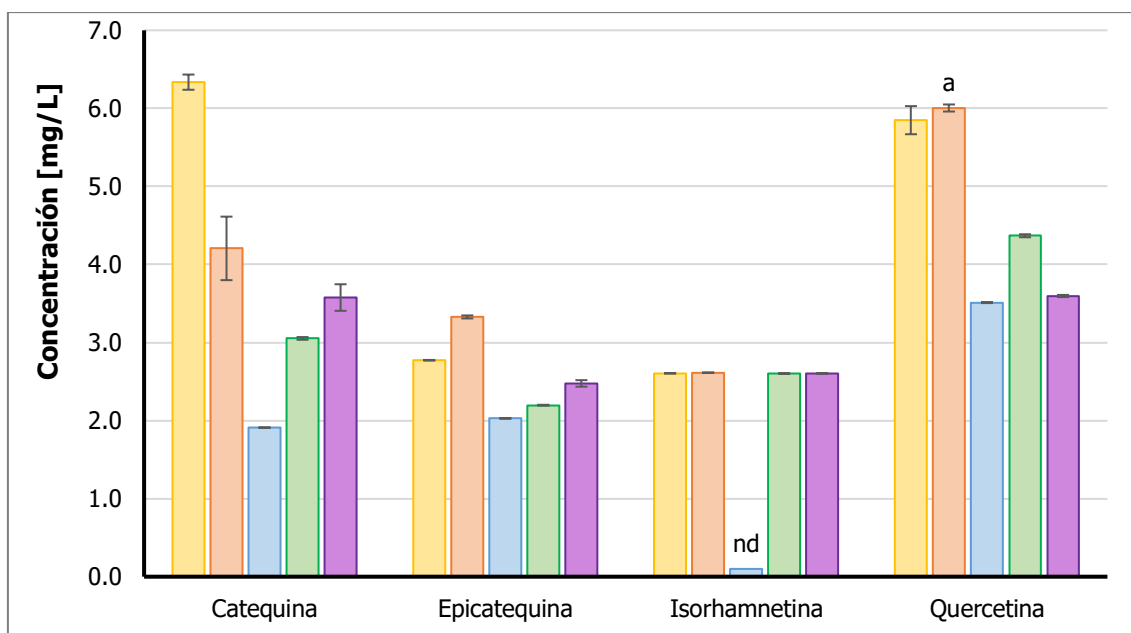


Figura 37. Representación gráfica de las concentraciones de los flavonoides en los extractos de mosto. Airén (■) Gewürztraminer (■), Sauvignon blanc (■), Verdejo (■), Tempranillo (■). La letra a indica que no existe diferencia estadísticamente significativa con la variedad Airén.

La esuletina no pertenece a ninguna de las familias polifenólicas previamente descritas. Ha sido el polifenol con menor concentración registrada en todos los varietales: 2,2mg/L±0,21 en Gewürztraminer, 2,19mg/L±0,17 en Sauvignon blanc, 2,17mg/L±0,11 en Airén, 2,169mg/L±0,16 en Verdejo y 2,16mg/L±0,18 en Tempranillo. La cantidad de esuletina es muy similar en todos los extractos, si bien el análisis ANOVA indica diferencias estadísticamente significativas en todos los casos que como ocurre en otros casos, no son relevantes aplicando el criterio de "fold of change".

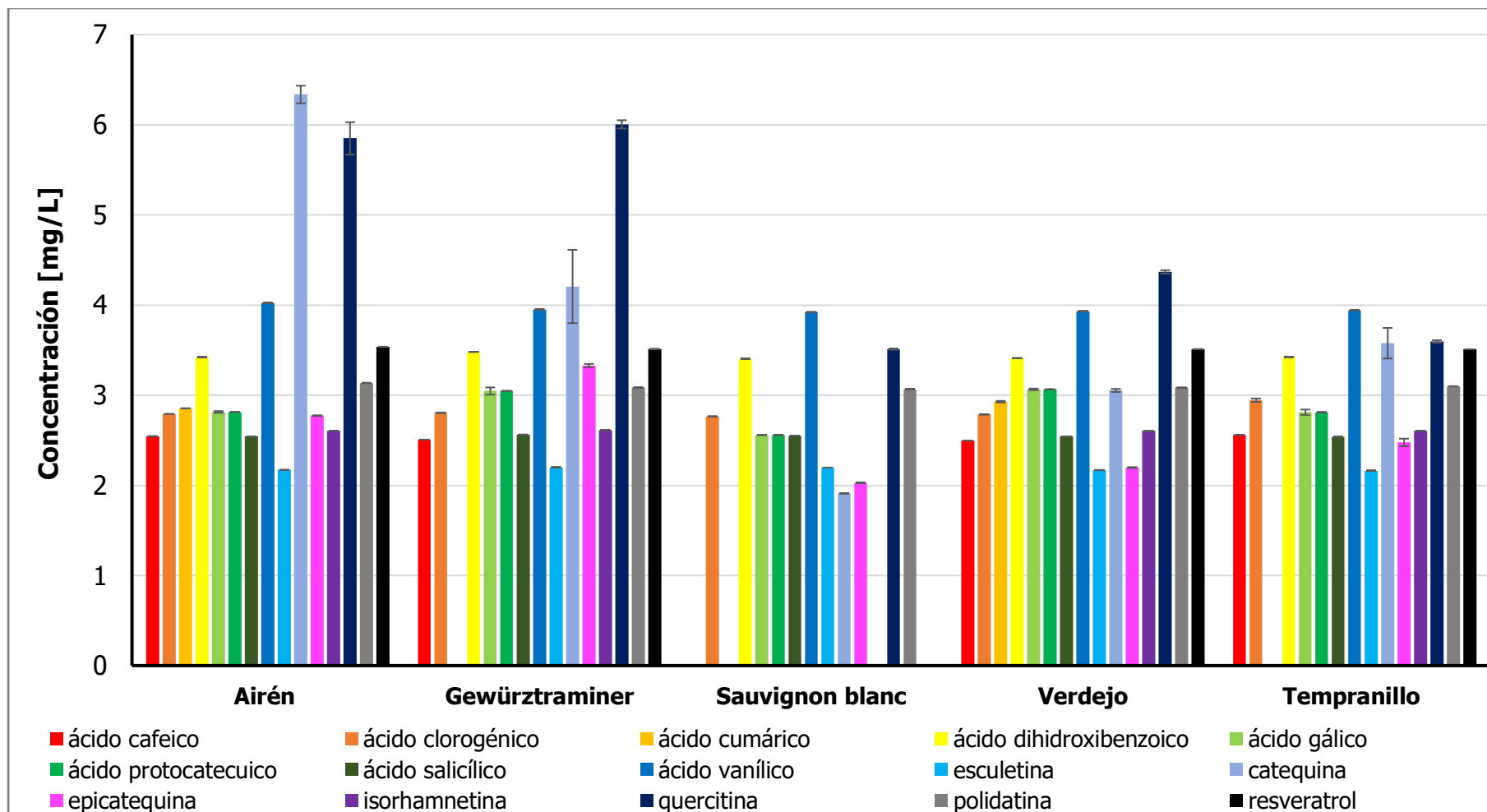


Figura 38: Representación gráfica del perfil polifenólico de los distintos extractos de variedades de mosto.

El conjunto de resultados obtenidos de la cuantificación mediante HPLC-MS muestra un perfil polifenólico distinto para cada uno de los varietales estudiados (Figura 38). Además, según el análisis de varianza ANOVA, más del 90% de las diferencias de concentración en los polifenoles estudiados son estadísticamente significativas. No obstante, este resultado se ha matizado con el valor de "*fold of change*" que indica que tan solo un 16,7% de las diferencias estadísticamente significativas tienen relevancia funcional. Este porcentaje corresponde a tres polifenoles concretos, la catequina, la quercetina, y la epicatequina en menor medida, ya que el nivel de relevancia es de nivel bajo. El resto de los polifenoles aparecen en una cantidad similar en todas las variedades, lo que indica que la variedad Airén es igual de valiosa e interesante a nivel polifenólico que el resto. En su conjunto, el análisis del perfil de los 15 polifenoles estudiados en este trabajo indica que los extractos de mosto Airén y Gewürztraminer son los que presentan la mayor complejidad polifenólica de los mostos analizados, destacando el elevado contenido en catequina y quercetina.

4.5.4. Detección y cuantificación de polifenoles en mosto concentrado Airén de diferente grado Brix mediante HPLC-MS.

A partir de los extractos de polifenoles de las muestras de mosto Airén en las 3 etapas industriales estudiadas, se ha realizado la identificación y cuantificación de los 16 polifenoles seleccionados en los mostos de variedades siguiendo el mismo procedimiento experimental descrito con anterioridad. Se quiere determinar si el proceso industrial para la obtención de mosto concentrado normal (MCN) o mosto concentrado decolorado (MCD), afecta a la variedad y la concentración de los polifenoles presentes en el mosto. Se ha calculado el efecto del proceso en la cantidad de polifenoles en el mosto concentrado, teniendo en cuenta el valor teórico de concentración esperado a partir de la cuantificación en la muestra inicial.

4.5.4.1. Cuantificación de polifenoles en muestras de mosto concentrado normal (MCN).

El análisis de los ácidos fenólicos: cafeico, clorogénico, cumárico, dihidroxibenzoico, ferúlico, gálico, protocatecuico, salicílico y vanílico, muestra que todos están presentes en el mosto concentrado final. En todos los casos se aprecia un aumento en la concentración de los polifenoles en las muestras de mosto concentrado, si bien este incremento no es proporcional al incremento en la concentración de azúcares que se obtiene por el proceso de evaporación de agua (Tabla 22, Figura 39). De hecho, al comparar los datos reales con los teóricos basados en la concentración detectada de cada polifenol en el mosto inicial, se obtienen porcentajes de pérdida que oscilan entre el 71% del ácido ferúlico y el 51% del ácido cumárico. Estos datos indican que el proceso de concentración afecta negativamente a la estructura de los ácidos fenólicos del mosto y aunque siguen estando presentes en el mosto concentrado final, su concentración es muy inferior a lo que cabría esperar (Tabla 22, Figura 39).

Tabla 22. Concentración de ácidos fenólicos en extractos de mosto normal en las tres etapas del proceso de concentración (mg/L±desviación estándar). Se incluye el porcentaje de pérdida de cada compuesto en el mosto concentrado final por efecto del proceso industrial de concentración.

Polifenol	Muestra	Concentración real HPLC-MS [mg/L] ± DS	Concentración teórica MCNf (mg/L)	Pérdida (%)
Ácido cafeico	MCNi	4,104±0,003	-	-
	MCNm	4,131±0,001	6,48	36,26
	MCNf	4,57±0,011	14,04	67,45
Ácido clorogénico	MCNi	3,2203±0,0004	-	-
	MCNm	3,236±0,001	5,08	36,36
	MCNf	3,361±0,007	11,02	69,49
Ácido cumárico	MCNi	3,14±0,02	-	-
	MCNm	3,24±0,11a	4,96	34,65
	MCNf	5,23±0,14	10,75	51,32
Ácido dihidroxibenzoico	MCNi	3,296±0,012	-	-
	MCNm	3,497±0,036	5,52	36,67
	MCNf	4,496±0,088	11,96	62,4
Ácido ferúlico	MCNi	3,412±0,007	-	-
	MCNm	3,334±0,002	5,39	38,1
	MCNf	3,31±0,03	11,67	71,64
Ácido gálico	MCNi	3,41±0,01	-	-
	MCNm	3,796±0,071	5,38	29,49
	MCNf	5,5±0,2	11,67	52,56
Ácido protocatecuico	MCNi	3,55±0,01	-	-
	MCNm	3,75±0,04	5,61	33,18
	MCNf	4,7±0,1	12,15	61,4
Ácido salicílico	MCNi	2,523±0,001	-	-
	MCNm	2,526±0,002	3,98	36,6
	MCNf	2,621±0,006	8,63	69,64
Ácido vanílico	MCNi	3,663±0,001	-	-
	MCNm	3,665±0,001	5,78	36,59
	MCNf	3,717±0,001	12,53	70,34

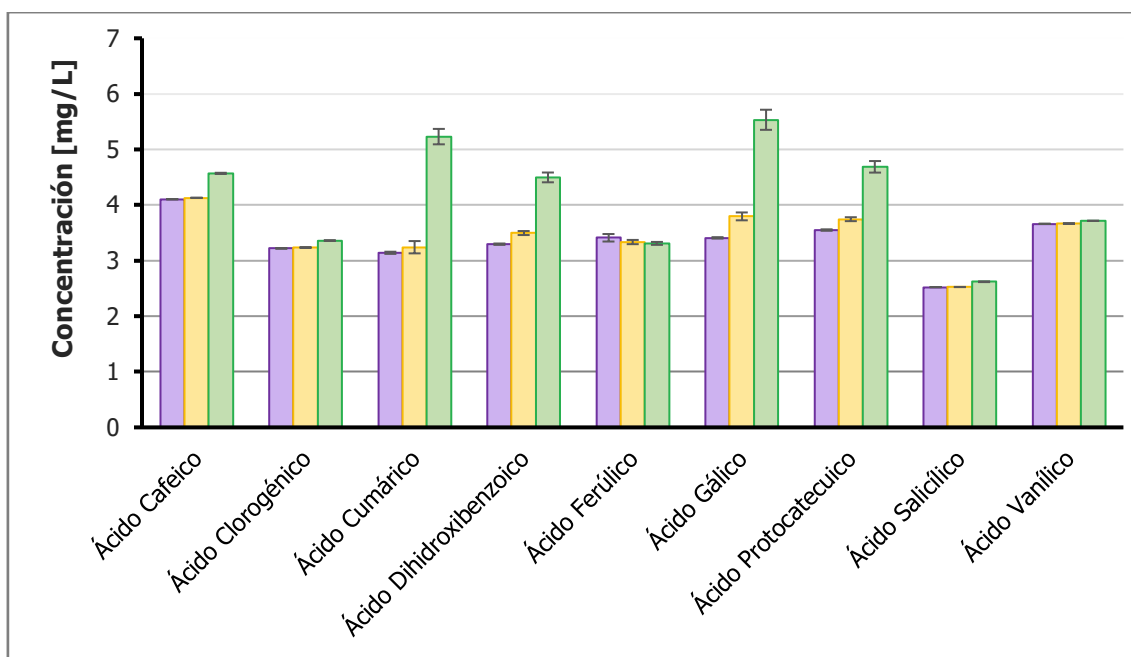


Figura 39. Representación gráfica de las concentraciones de ácidos fenólicos en los extractos de mosto de las tres muestras de las etapas industriales de concentración del mosto normal: inicial (MCNi), medio (MCNm) y final (MCNf).

En el caso de los estilbenos estudiados, polidatina y resveratrol, ocurre algo similar a lo descrito anteriormente. Se observa un pequeño incremento en la concentración de ambos polifenoles a medida que se concentra la muestra, pero este incremento no es proporcional a la reducción de volumen al que se somete el mosto en el proceso (Tabla 23, Figura 40). En estos casos se produce un porcentaje de pérdida de un 67,7% para la polidatina y de un 69,6% para el resveratrol.

Tabla 23. Concentración de estilbenos en extractos de mosto normal en las tres etapas del proceso de concentración (mg/L±desviación estándar). Se incluye el porcentaje de pérdida de cada compuesto en el mosto concentrado final por efecto del proceso industrial de concentración.

Polifenol	Muestra	Concentración real HPLC-MS [mg/L] ± DS	Concentración teórica (mg/L)	Pérdida (%)
Polidatina	MCNi	2,531±0,002	-	-
	MCNm	2,55±0,01	3,99	36,09
	MCNf	2,80±0,03	8,66	67,66
Resveratrol	MCNi	4,893±0,002	-	-
	MCNm	5,07±0,03	7,72	34,34
	MCNf	5,083±0,006	16,74	69,63

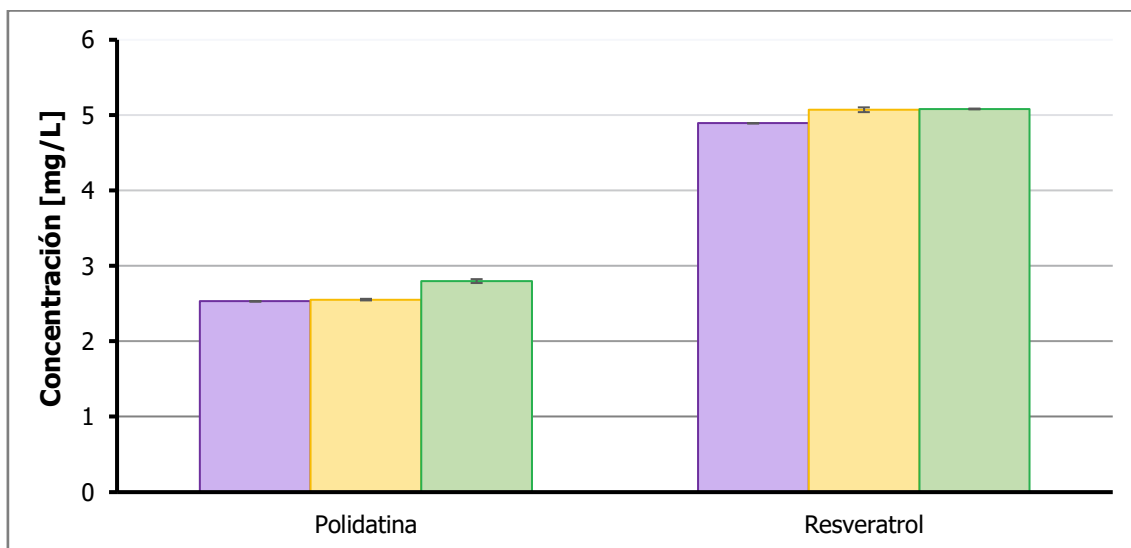


Figura 40. Representación gráfica de las concentraciones de ácidos fenólicos en los extractos de mosto de las tres muestras de las etapas industriales de concentración del mosto normal: inicial (MCNi), medio (MCNm) y final (MCNf).

En el grupo de los flavonoides estudiados en el mosto normal: catequina, epicatequina, isorhamnetina y quercetina se aprecia un aumento de concentración en todos los polifenoles en la etapa final, en la cual resaltan la epicatequina (73%), catequina (110%) y la quercetina (526%). Estos resultados sugieren que estos flavonoides no se pierden durante el proceso de concentración del mosto normal en la misma medida que otros polifenoles de distintas familias polifenólicas. No obstante, sí existe una pérdida de dos polifenoles debido al proceso industrial de concentración, siendo para catequina de un 38,4%, para epicatequina del 49,3%. La isorhamnetina no se detectó en la etapa inicial de concentración y no es posible obtener la cuantificación de aumento de concentración, pero sí se ha calculado la variación de la concentración entre la etapa media y final y se ha visto una ligera variación del 3,3%. Estos datos no han sido reflejados en la tabla, porque se desea comparar el estado final con el inicial. Por último, la quercetina es un polifenol que no se ha sufrido pérdidas durante el proceso, sino que se ha registrado un valor un 83% superior al teórico. Este resultado sugiere que el proceso de concentración hace que se libere la quercetina glucosilada, quedando en estado libre en la etapa final, y pueda cuantificarse más cantidad. No obstante, este comportamiento de la quercetina debe ser confirmado con más experimentos. (Tabla 24, Figura 41).

Tabla 24. Concentración de flavonoides en extractos de mosto normal en las tres etapas del proceso de concentración (mg/L±desviación estándar). Se incluye el porcentaje de pérdida o ganancia de cada compuesto en el mosto concentrado final por efecto del proceso industrial de concentración. nd = no detectado.

Polifenol	Muestra	Concentración real HPLC-MS [mg/L] ± DS	Concentración teórica (mg/L)	Variación %
Catequina	MCNi	5,26±0,09	-	-
	MCNm	7,4±0,4	8,3	- 11,47
	MCNf	11,1±0,5	17,99	- 38,37
Epicatequina	MCNi	1,84±0,01	-	-
	MCNm	2,7±0,1	2,91	- 7,86
	MCNf	3,20±0,03	6,3	- 49,26
Isorhamnetina	MCNi	nd	-	-
	MCNm	2,528±0,002 ^a	-	-
	MCNf	2,613±0,006 ^b	-	-
Quercetina	MCNi	8,7±0,3	-	-
	MCNm	15,30±1,03	13,68	+ 11,81
	MCNf	54,3±1,3	29,64	+ 83,12

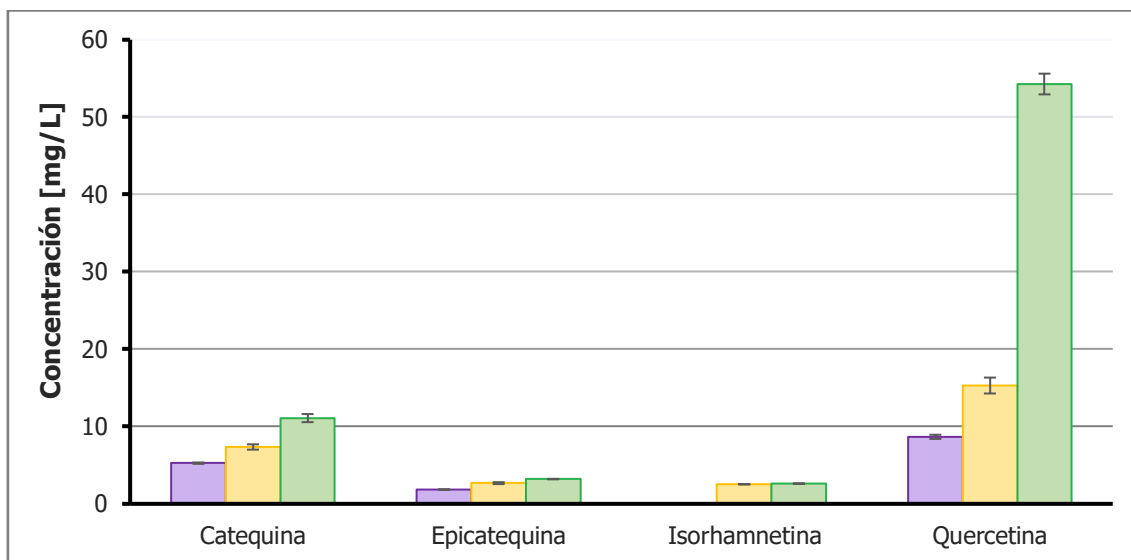


Figura 41. Representación gráfica de las concentraciones de ácidos fenólicos en los extractos de mosto de las tres muestras de las etapas industriales de concentración del mosto normal: inicial (■ MCNi), medio (■ MCNm) y final (■ MCNf).

La esuletina no pertenece a ninguna de las familias polifenólicas previamente descritas. Ha sido el polifenol con menor concentración registrada en todas las etapas del proceso de concentración: MCNi: $2,054 \pm 0,001$, MCNm: $2,057 \pm 0,0001$ y MCNf: $2,078 \pm 0,001$, y el porcentaje de pérdida en la etapa final fue de un 71,4%.

El conjunto de los resultados muestra que sí existe una pérdida de la mayoría de los polifenoles durante el proceso de concentración industrial del mosto. Se detecta menor concentración de polifenoles que la que teóricamente se ha calculado y el comportamiento de los polifenoles no es similar al comportamiento mostrado por los azúcares durante el proceso de concentración. Destaca la quercetina porque en su etapa final sí que muestra que se han cuantificado más moléculas que las calculadas teóricamente, lo que sugiere que podrían estar unidas a azúcares en la muestra inicial antes de comenzar el proceso de concentración y durante el proceso se han liberado dichas moléculas de los enlaces con los azúcares. Otros 4 polifenoles muestran una pérdida de polifenoles durante el proceso de concentración industrial inferior al 55%: ácido cumárico (51%), ácido gálico (52%), catequina (39%) y epicatequina (49%), por lo que su concentración durante el proceso no sufre tanto como el resto de polifenoles estudiados, que oscilan entre un 61,4% y 71,4%.

4.5.4.2. Cuantificación de polifenoles en muestras de mosto concentrado decolorado (MCD).

A continuación, se muestran los resultados de los polifenoles, agrupados por familias polifenólicas, identificados y cuantificados en los extractos de mosto concentrado decolorado (MCD). Se han analizado estadísticamente de manera similar a las muestras de los extractos de mosto concentrado normal (MCN) así como también se ha cuantificado el efecto que tiene el proceso de concentración del mosto en la concentración de los polifenoles.

El análisis de los ácidos fenólicos: cafeico, clorogénico, cumárico, dihidroxibenzoico, ferúlico, gálico, protocatecuico, salicílico y vanílico, muestra que todos están presentes en el mosto concentrado decolorado final. En todos los casos se aprecia un aumento en la concentración de los polifenoles en las muestras de mosto concentrado, si bien este incremento no es proporcional al incremento en la concentración de azúcares que se obtiene por el proceso concentración (Tabla 25, Figura 42). De hecho, al comparar los datos reales con los teóricos basados en la concentración detectada de cada polifenol en el mosto inicial, la pérdida de los polifenoles debido al proceso industrial de concentración oscila entre un 64,2% del ácido gálico y 70,7% del ácido vanílico. Estos datos indican que el proceso de concentración afecta negativamente a la estructura de los ácidos fenólicos del mosto y aunque siguen estando presentes en el mosto concentrado final, su concentración es muy inferior a lo que cabría esperar (Tabla 25, Figura 42).

Tabla 25. Concentración de ácidos fenólicos en extractos de mosto normal en las tres etapas del proceso de concentración (mg/L±desviación estándar). Se incluye el porcentaje de pérdida de cada compuesto en el mosto concentrado final por efecto del proceso industrial de concentración.

Polifenol	Muestra	Concentración real HPLC-MS [mg/L] ± DS	Concentración teórica (mg/L)	Pérdida (%)
Ácido cafeico	MCDi	4,0127±0,0006	-	-
	MCDm	4,0294±0,0005	6,34	36,40
	MCDf	4,076±0,002	13,73	70,31
Ácido clorogénico	MCDi	3,201±0,001	-	-
	MCDm	3,2049±0,0002	5,05	36,59
	MCDf	3,232±0,006	10,95	70,49
Ácido cumárico	MCDi	2,81±0,02	-	-
	MCDm	2,810±0,008 ^a	4,43	36,64
	MCDf	2,91±0,02	9,61	69,76
Ácido dihidroxibenzoico	MCDi	3,08±0,01	-	-
	MCDm	3,142±0,006	4,85	35,28
	MCDf	3,418±0,005	10,52	67,51
Ácido ferúlico	MCDi	3,20±0,04	-	-
	MCDm	3,34±0,05	5,05	33,78
	MCDf	3,44±0,04	10,94	68,52
Ácido gálico	MCDi	3,30±0,02	-	-
	MCDm	3,36±0,02	5,21	35,56
	MCDf	4,05±0,105	11,30	64,19
Ácido protocatecuico	MCDi	3,34±0,01	-	-
	MCDm	3,407±0,004	5,27	35,36
	MCDf	3,59±0,06	11,42	68,60
Ácido salicílico	MCDi	2,511±0,001	-	-
	MCDm	2,511±0,001 ^b	3,96	36,67
	MCDf	2,5271±0,0004	8,59	70,58
Ácido vanílico	MCDi	3,6583±0,0005	-	-
	MCDm	3,6582±0,0006 ^c	5,78	36,67
	MCDf	3,6643±0,0008	12,52	70,72

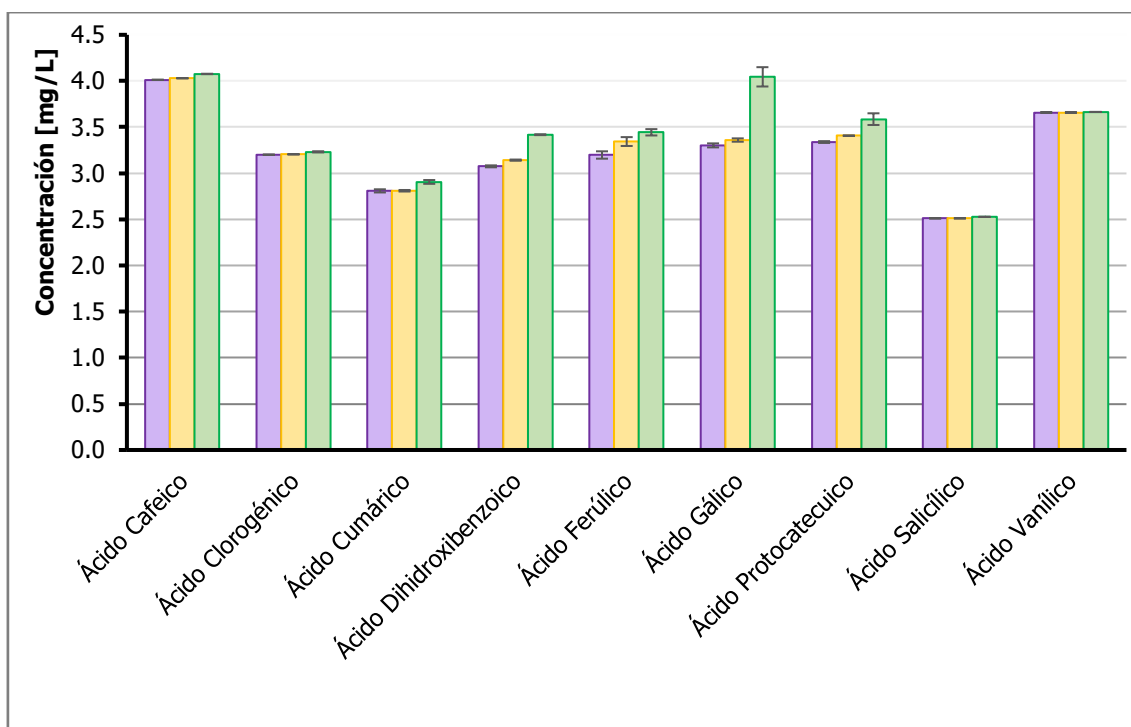


Figura 42. Representación gráfica de las concentraciones de ácidos fenólicos en los extractos de mosto de las tres muestras de las etapas industriales de concentración del mosto decolorado: inicial (MCDi), medio (MCDm) y final (MCDf).

En el caso de los estilbenos estudiados, polidatina y resveratrol, ocurre algo similar a lo descrito en el grupo anterior. Se observa un ligero incremento de un 1% en la concentración de ambos polifenoles a medida que se concentra la muestra, pero este incremento no es proporcional a la reducción de volumen al que se somete el mosto en el proceso (Tabla 26, Figura 43). En estos casos se produce un porcentaje de pérdida de un 70,7% para la polidatina y de un 70,8% para el resveratrol.

Tabla 26. Concentración de estilbenos en extractos de mosto normal en las tres etapas del proceso de concentración (mg/L±desviación estándar). Se incluye el porcentaje de pérdida de cada compuesto en el mosto concentrado final por efecto del proceso industrial de concentración.

Polifenol	Muestra	Concentración real HPLC-MS [mg/L] ± DS	Concentración teórica (mg/L)	Pérdida (%)
Polidatina	MCDi	2,5016±0,0001	-	-
	MCDm	2,5002±0,00001	3,95	36,66
	MCDf	2,509±0,0001	8,56	70,69
Resveratrol	MCDi	3,2404±0,0002	-	-
	MCDm	3,2404±0,0003 ^a	5,12	36,67
	MCDf	3,2415±0,0003	11,09	70,76

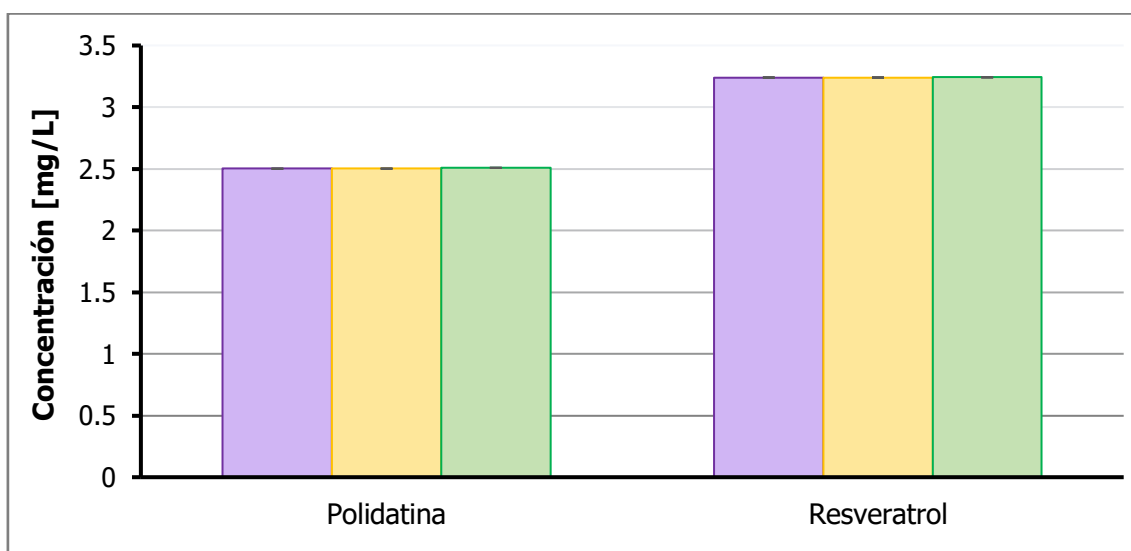


Figura 43. Representación gráfica de las concentraciones de ácidos fenólicos en los extractos de mosto de las tres muestras de las etapas industriales de concentración del mosto decolorado: inicial (MCDi), medio (MCDm) y final (MCDf).

En el grupo que contiene los flavonoides estudiados en el mosto decolorado: catequina, epicatequina, isorhamnetina y quercetina, se aprecia un aumento de concentración en todos los polifenoles en la etapa final, en la cual resaltan la epicatequina (10%), catequina (46%) y la quercetina (89%). Estos resultados sugieren que estos flavonoides no se pierden durante el proceso de concentración del mosto decolorado en la misma medida que otros polifenoles de distintas familias. No obstante, sí existe una pérdida de dos polifenoles debido al proceso industrial de concentración, siendo para la epicatequina del 67,8%, para la catequina de un 57,7% y para la quercetina de un 44,9%. La isorhamnetina no se detectó en la etapa inicial de concentración y no es posible obtener la cuantificación de aumento de concentración, pero sí se ha calculado la variación de la concentración entre la etapa media y final y se ha visto una ligera variación del 0,12%. Estos datos no han sido reflejados en la tabla, porque se desea comparar el estado final con el inicial. (Tabla 27, Figura 44).

Tabla 27. Concentración de flavonoides en extractos de mosto normal en las tres etapas del proceso de concentración (mg/L±desviación estándar). Se incluye el porcentaje de pérdida de cada compuesto en el mosto concentrado final por efecto del proceso industrial de concentración. nd = no detectado.

Polifenol	Muestra	Concentración real HPLC-MS [mg/L] ± DS	Concentración teórica (mg/L)	Pérdida (%)
Catequina	MCDi	3,081±0,007	-	-
	MCDm	3,34±0,07	4,87	30,12
	MCDf	4,5±0,5	10,54	57,74
Epicatequina	MCDi	3,089±0,002	-	-
	MCDm	3,149±0,008	4,88	35,42
	MCDf	3,399±0,11	10,57	67,82
Isorhamnetina	MCDi	nd	-	-
	MCDm	2,5125±0,0004 ^a	-	-
	MCDf	2,5155±0,0007 ^b	-	-
Quercetina	MCDi	3,48±0,02	-	-
	MCDm	4,797±0,02	5,49	12,66
	MCDf	6,6±0,25	11,90	44,90

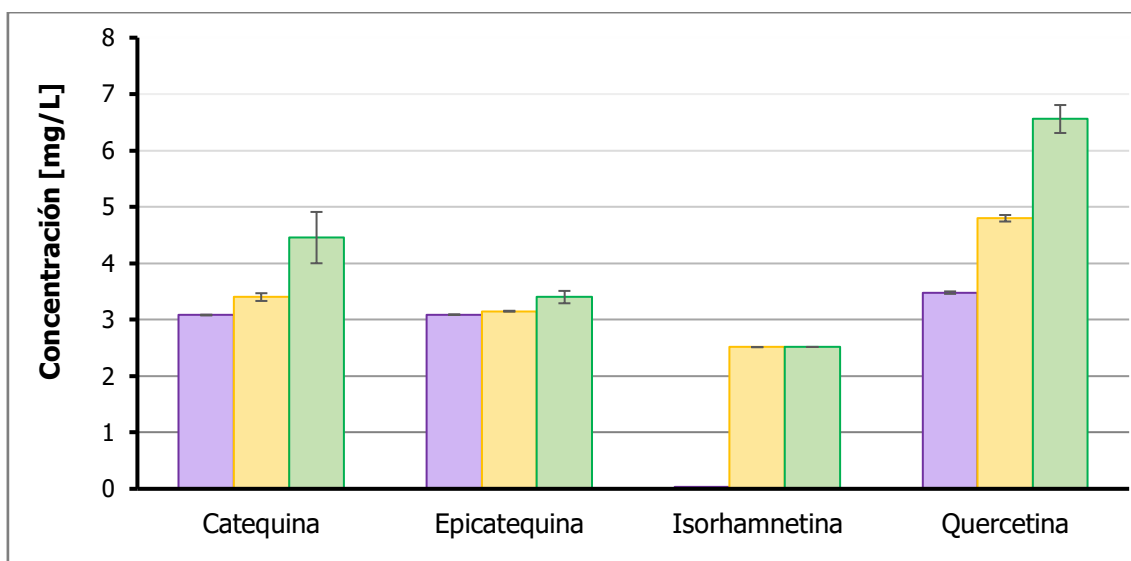


Figura 44. Representación gráfica de las concentraciones de ácidos fenólicos en los extractos de mosto de las tres muestras de las etapas industriales de concentración del mosto decolorado: inicial (MCDi), medio (MCDm) y final (MCDf).

La esculetina no pertenece a ninguna de las familias polifenólicas previamente descritas. Ha sido el polifenol con menor concentración registrada en todas las etapas del proceso de concentración: MCDi: $2,05242 \pm 0,0001$, MCDm: $2,0528 \pm 0,0001$ y MCDf: $2,0524 \pm 0,0001$, y el porcentaje de pérdida en la etapa final fue de un 70,7%.

En conjunto, los resultados en el mosto decolorado muestran el porcentaje de pérdida que sufren los polifenoles durante el proceso de concentración oscila entre un 12,7% y 36,7% para la etapa media y entre un 44,9% y 70,7% en la etapa final, excepto cuando se analiza el comportamiento de la quercetina, donde se observa una pérdida del 45% y de un 57% en el caso de la catequina. Son los únicos 2 polifenoles en el mosto decolorado que muestran una mejor resistencia a la pérdida de concentración bajo las condiciones del proceso de concentración, ya que su composición inicial se ha visto menos afectada. Aunque los ambos han sufrido pérdida cuando se compara con la concentración teórica y dicha pérdida no ha sido tan acusada como en los otros polifenoles estudiados en las muestras de mosto concentrado decolorado (MCD).

En resumen, se estudiaron 23 polifenoles tanto en las muestras de mosto concentrado como decolorado, (Tabla 15) y solamente se pudieron cuantificar 16 polifenoles en el mosto de uva (Tabla 16). Aun habiendo conseguido la optimización de los parámetros de ionización, nuestras muestras de mosto no presentaron dichos polifenoles de manera fiable, como fue el caso de ácido elágico, apigenina, kaempferol, luteolina, siringaldehído, rutina y viniferina. En las muestras de varietales, el polifenol de ácido ferúlico tampoco no ha sido cuantificado de manera fiable ($r_2 > 0,99$).

Los resultados de cuantificación de polifenoles obtenidos tras el análisis de los extractos de las distintas etapas de concentración muestran, que en la mayoría de los polifenoles existen diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan las etapas media y final frente a la inicial, tanto en el proceso normal como decolorado. Más del 95% de las diferencias son estadísticamente significativas, pero solamente destacan la catequina y la quercetina por encima del resto ya que la pérdida de concentración en la etapa final con respecto a la inicial no es tan acusada como el resto de polifenoles. Además, los resultados sugieren que las diferencias en el comportamiento de los polifenoles cuantificadas en el mosto decolorado y normal pueden deberse a que el proceso de filtración previo, al que se somete el mosto decolorado, afecta negativamente a la concentración final de los polifenoles durante la concentración. Dicho efecto de concentración no es tan acusado en la concentración de los polifenoles en el mosto normal, aunque este efecto producido por la filtración inicial del mosto decolorado debe ser estudiado en mayor profundidad.

4.6. Revisión sistemática y meta-análisis sobre el efecto de los polifenoles de uva en leucemia.

El objetivo de esta parte del trabajo fue determinar el efecto de los polifenoles de uva sobre células tumorales de leucemia. Para ello, se hizo una revisión sistemática, con el fin de reunir toda la evidencia empírica publicada en los últimos años, sobre la influencia de los polifenoles de uva en el desarrollo este tipo de cáncer.

El estudio se ha hecho siguiendo la estructura de búsqueda descrita en el apartado 3.2.7. de materiales y métodos, en base al procedimiento descrito en el manual Cochrane¹⁸². Lo primero que se hizo, fue plantear la pregunta central de la investigación, denominada pregunta PICO (P, hace referencia a la población que se desea analizar. I, a la intervención realizada sobre esa población. C, a las comparaciones descritas. O, a los *outcomes*, o resultados que se esperan tras el estudio y permiten obtener conclusiones en respuesta a la pregunta planteada). A partir de esta pregunta, se realizará la búsqueda y se definirá el modo de realizar la selección de los artículos a incluir en el meta-análisis, para llegar a las conclusiones finales. La pregunta "PICO" que nos planteamos en este estudio fue: ¿Tienen los polifenoles de uva algún efecto en la proliferación de las células cancerígenas de leucemia?

Para dar respuesta a la pregunta PICO en el meta-análisis se abordaron tres preguntas concretas. En el resultado 1 (O1, *outcome 1*), busca determinar el efecto de polifenoles específicos presentes en uva sobre la proliferación de células de leucemia. El resultado 2 (O2, *outcome 2*), analiza si el efecto de los polifenoles de uva es dependiente del origen de las células tumorales. Y el resultado 3 (O3, *outcome 3*), quiere determinar si los polifenoles de uva tienen un efecto directo en el ciclo celular de las células de leucemia. Los resultados obtenidos de este estudio han sido aceptados para su publicación en la revista *Food Reviews International* y ya están accesibles *on line* ²³⁹.

4.6.1. Estrategia de búsqueda bibliográfica y extracción de datos.

Para dar respuesta a esta pregunta, se realizó una búsqueda en la literatura publicada en los últimos 50 años, analizando las bases de datos: Biblioteca Cochrane²³¹, PUBMED²³⁰, MEDLINE²⁴⁰, CINAHL²³⁴ y EMBASE²³².

Para la selección de los artículos se han seguido las directrices recogidas en la guía PRISMA para la realización de revisiones sistemáticas y meta-análisis^{184-186, 229}. La búsqueda bibliográfica se realizó con las palabras clave: polifenol, uva y leucemia y aportó un total de 257 referencias publicadas en los últimos 50 años, sobre polifenoles de uva que se han ensayado en leucemia. De éstos, 125 eran duplicados por lo que quedaron 132 referencias para continuar con la revisión por pares, como está descrito en el apartado 3.2.7.2 de materiales y métodos. Los criterios de selección de los artículos fueron: 1) ensayos controlados, en nuestro caso datos experimentales procedentes de ensayos con controles en cada experimento; 2) estudios realizados con cultivos primarios o líneas celulares de leucemia humana; 3) estudios con polifenoles puros o con extractos de polifenoles derivados de la uva. Los criterios de exclusión fueron: 1) ensayos no controlados y 2) uso de polifenoles que no estén presentes en la uva. Se excluyeron los estudios realizados con polifenoles que no procedían de la uva o sus derivados y los que no incluían los controles adecuados (apartado 3.2.7.3 de materiales y métodos). El sistema de trabajo en esta primera fase fue realizado con la herramienta Covidence²³⁵, que exigía la lectura del título y el resumen de cada artículo, aplicar los criterios de inclusión y responder y en base a los criterios de inclusión/exclusión y responder: No, Puede o Si, para cada uno de los artículos seleccionados. El equipo de revisores estuvo compuesto por 4 personas, todos responsables para resolver los conflictos o discrepancias. La sistemática que se estableció para realizar la revisión fue la siguiente:

- i. El primer revisor evaluó las 132 referencias, dando un veredicto sobre cada una, de este modo se conseguía tener el primer voto en cada referencia.
- ii. El resto de revisores se repartieron a partes iguales los 132 artículos para emitir un segundo voto en cada referencia.
- iii. Los conflictos fueron resueltos por los tres revisores que se habían repartido los 132 artículos previamente, y resolvieron los conflictos emitiendo su voto en aquellos artículos que no habían revisado previamente

Con la primera lectura del resumen, se excluyeron 74 artículos que no cumplían alguno de los criterios establecidos, quedando 58 para su lectura completa. La segunda fase de la selección de referencias consistió en la lectura de texto completo de los 58 artículos que habían sido previamente seleccionados. a metodología de revisión fue realizada por pares, de manera similar a la realizada en la primera fase; los revisores leyeron los textos completos e indicaron los motivos de la selección o exclusión indicando los criterios de elegibilidad que cumplía, o bien los motivos de la exclusión. Tras esta segunda revisión se seleccionaron 24 artículos que pasaron a la fase de extracción de datos. El resto fueron excluidos del estudio, 23 artículos porque los polifenoles utilizados no eran de uva, 5 porque no trabajaban con células humanas y 6 por no ser una intervención experimental correcta (Figura 45).

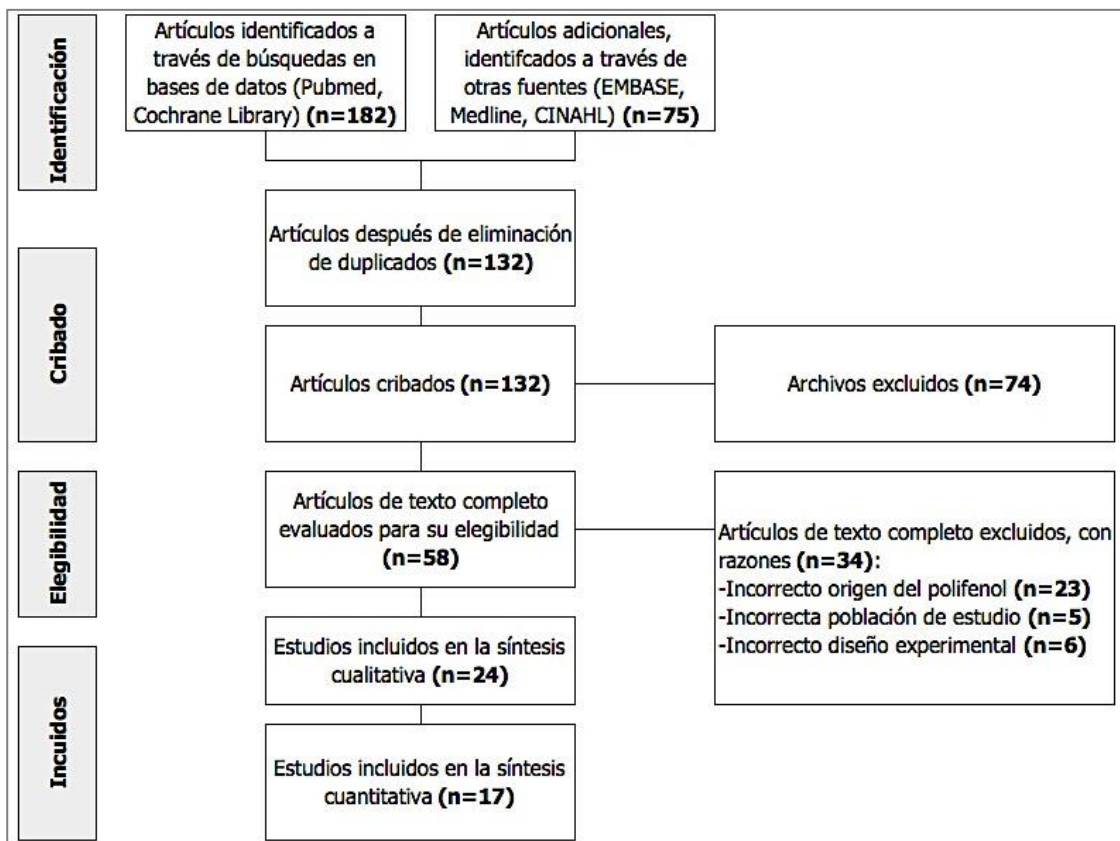


Figura 45. Diagrama de flujo PRISMA del proceso de selección de trabajos a incluir en la síntesis cuantitativa sobre el efecto de los polifenoles de uva en la proliferación de células de leucemia humanas¹⁸⁵.

La tercera fase fue la extracción de los datos de los artículos seleccionados para realizar el meta-análisis. Se desarrolló utilizando la herramienta "RevMan" para la generación de los "forestplot" y "flowchart" según norma PRISMA¹⁸⁵. (Figura 45).

4.6.2. Descripción de los resultados buscados con el meta-análisis.

Con este estudio se buscan tres resultados específicos que sirvan para dar respuesta a la pregunta PICO. El resultado 1 (O1, de *outcome 1*), busca determinar el efecto de polifenoles de uva concretos sobre la proliferación de líneas celulares de leucemia. El resultado 2 (O2), analiza el efecto de los polifenoles de uva en la proliferación de diferentes líneas celulares de leucemia humana agrupadas por linaje celular. Y el resultado 3 (O3), va dirigido a determinar si los polifenoles de uva inducen arresto del ciclo celular en las células de leucemia. De los 24 artículos seleccionados tras la evaluación cualitativa, solamente 17 fueron finalmente incluidos para el estudio cuantitativo. La tabla 28 recoge los artículos incluidos y la información útil que proporcionan, para los tres *outcomes* estudiados, atendiendo a los criterios establecidos con anterioridad. Se puede ver que la mayoría de los artículos aportan datos para los dos primeros resultados buscados en el estudio, pero en cambio pocos artículos contienen datos analizables sobre el efecto en el ciclo celular.

Tabla 28. Artículos científicos incluidos en el meta-análisis. O1 (resultado 1): efecto de polifenoles específicos de la uva sobre la proliferación de células de leucemia. O2 (resultado 2): efecto de los polifenoles de la uva sobre la proliferación de células leucemia de distinto origen. O3 (resultado 3): Efecto de los polifenoles de la uva sobre la parada del ciclo celular.

Autores	Año	O1	O2	O3
Billard et al ²⁴¹	2002	X	X	
Can et al ²⁴²	2012	X	X	
Chen et al ²⁴³	2005	X	X	
Espino et al ²⁴⁴	2013			X
Ferry-Dumazet et al ¹⁷¹	2002	X	X	
Gao et al ²⁴⁵	2009	X	X	
Ghorbani et al ²⁴⁶	2015	X	X	
Gokbulut et al ²⁴⁷	2013	X	X	X
Hu et al ²⁴⁸	2006	X	X	
Katsuzaki et al ²⁴⁹	2003	X	X	
León-González et al ²⁵⁰	2017	X	X	
Liao et al ²⁵¹	2012	X	X	X
Mertens-Talcott et al ¹⁸¹	2003	X	X	X
Mertens-Talcott et al ²⁵²	2008	X	X	X
Sharif et al ²⁵³	2010	X	X	
Siedlecka-Kroplewska et al ²⁵⁴	2012	X	X	X
Wang et al ²⁵⁵	2012	X	X	X

Hubo 7 estudios que se excluyeron del meta-análisis porque durante el proceso de extracción de datos se observó que los resultados experimentales que incluían no servían para dar respuesta a la pregunta inicial planteada y no eran comparables con los datos obtenidos del resto de los artículos incluidos en el estudio (Figura 45, Tabla 29).

Tabla 29. Artículos no incluidos en el meta-análisis.

Autores	Año	Razones para el rechazo
Asou <i>et al</i> 256	2002	Los datos mostrados no fueron comparables para los resultados 1, 2 y no se incluyeron datos para el resultado 3.
Horvath <i>et al</i> 257	2005	No se incluyen datos para los resultados 1, 2 y 3
Liang <i>et al</i> 258	2005	No se incluyen datos para los resultados 1, 2 y 3
O'Brien <i>et al</i> 259	2006	Los datos mostrados no fueron comparables para los resultados 1, 2 y no se incluyeron datos para el resultado 3.
Quiney <i>et al</i> 82	2004	No se incluyen datos para los resultados 1, 2 y 3
Sergediene <i>et al</i> 260	1999	Los datos mostrados no fueron comparables para los resultados 1, 2 y no se incluyeron datos para el resultado 3.
Spagnuolo <i>et al</i> 164	2012	Los datos mostrados no fueron comparables para los resultados 1, 2 y no se incluyeron datos para el resultado 3.

La tercera fase fue la extracción de los datos de los artículos seleccionados para realizar el meta-análisis. Se desarrolló utilizando la herramienta "RevMan" para la generación de los "forestplot" y "flowchart" según norma PRISMA (Figura 45).

La extracción de datos de los estudios seleccionados se realizó utilizando el procedimiento estandarizado desarrollado por PRISMA^{184-186, 229} que incluye la siguiente información: (1) nombre completo del autor, (2) año de publicación, (3) nombre del polifenol, (4) concentración de polifenol, (5) tipo de células de leucemia y (6) efecto sobre la proliferación celular. Para realizar el cribado, se eligió el software Covidence²³⁵, ya que facilita el trabajo en colaboración con Cochrane, con el fin de mejorar la producción y el uso de revisiones sistemáticas para la atención médica y el bienestar.

Con los datos extraídos de los 17 artículos analizados, se ha estudiado el efecto de 13 polifenoles de uva (resveratrol, quercetina, viniferina, apigenina, glucósido de cianidina, delphinidina, ácido elágico, kaempferol, malavidina, miricetina, petunidina, pterostilbeno y vineatrol) y 5 extractos de polifenoles derivados de la uva o el vino (GPE). Los datos incluidos en el meta-análisis se obtuvieron 48 h después del tratamiento con polifenoles a concentraciones: resveratrol 50 μ M, apigenina, glucósido de cianidina, delphinidina, ácido elágico, kaempferol, malvidina, miricetina, petunidina y pterostilbeno, viniferina y vineatrol 25 μ M, quercetina 10 μ M y 50/100 μ g/mL de GPE. Cabe destacar que el origen y composición polifenólica de los extractos utilizados en los estudios fueron diferentes, razón por la cual las intervenciones con GPE siempre se analizan en un subgrupo diferente. Espino *et al*²⁴⁴ utilizó extractos de semilla de uva Tempranillo a 6,160.01 \pm 160.14 mg/L equivalentes de ácido gálico (GAE); León-González *et al*²⁵⁰ utilizó extractos de orujo de uva a 365 mg/g GAE; Sharif *et al*²⁵³ utilizó extractos secos de vino tinto en polvo a 471 mg/g de GAE; Mertens-Talcott *et al*²⁵² ha usado extractos de uva Muscadine y Sauvignon a 10,269 \pm 36 y 9,932 \pm 22 mg/L GAE, respectivamente; Wang *et al*²⁵⁵; Gao *et al*²⁴⁵ y Hong *et al*²⁴⁸ extractos de semillas de uva comerciales enriquecidos con proantocianidinas, pero no se hizo referencia a GAE (Tabla 30).

En cuanto a las líneas celulares de leucemia estudiadas, cuatro de ellas derivaban de células mieloides tempranas (Em): K562, HL-60, AML 14.3D10, KCL22; dos eran de linaje monocítico (Mc): U937 y THP1; cuatro procedían de linfocitos B (LB): WSU-CLL, ESKOL, NALM-6, 232B4, y dos de linfocitos T (LT): MOLT-4 y JURKAT (Tabla 30).

Tabla 30. Artículos incluidos en el meta-análisis que muestran el número de experimentos útiles para la extracción de datos, ordenados por tipo de células de leucemia y polifenoles.

Artículo	Mieloides tempranas	Nº estudios	Artículo	Polifenol	Nº estudios
171, 242, 251, 255	K562	4	245, 248, 252, 253, 255, 261, 262	GPE	7
171, 245, 262	HL-60	3	171, 241, 242, 246, 247, 251	Resveratrol	6
248	AML 14.3D10	1	181, 243, 247	Quercetina	3
171	KCL22	1	241	Viniferina	2
Artículo	Monocíticas	Nº estudios	243	Apigenina	1
171, 245	U937	2	249	Cianidina glucosido	1
171	THP1	1	249	Delfinidina	1
Artículo	Linfocitos B	Nº estudios	181	Ácido elágico	1
171, 241	WSU-CLL	4	243	Kaempferol	1
241	ESKOL	3	249	Malavidina	1
246	NALM-6	1	243	Miricetina	1
247	232B4	1	249	Petunidina	1
Artículo	Linfocitos T	Nº estudios	263	Pterostilbeno	1
181, 249, 252, 263	MOLT-4	9	241	Vineatrol 10%	1
171, 243, 245, 253, 261	JURKAT	8	241	Vineatrol 25%	1

4.6.3. Evaluación del riesgo de sesgo.

Los datos incluidos en el meta-análisis proceden de ensayos realizados con cultivos *in vitro* de líneas celulares establecidas. No fue posible el análisis del sesgo siguiendo la metodología propuesta en el manual Cochrane, debido a que el manual no ha sido preparado para la evaluación de datos empíricos procedentes de experimentos con líneas celulares, sino para evaluar datos procedentes de estudios clínicos. Aun así, todos los datos proceden de experimentos realizados con líneas de leucemia humanas establecidas previamente descritas. Además, los polifenoles utilizados en todos los casos proceden de casas comerciales de fiabilidad certificada, como Sigma-Aldrich, JF-Natural Technology Co o ActiVin.

4.6.4. Resultados del meta-análisis

4.6.4.1. Efecto de polifenoles de uva en la proliferación de células de leucemia humana.

Se ha comparado la proliferación celular de cada línea celular a las 48h utilizando como referencia la concentración de cada polifenol descrita previamente (apartado 4.6.2), pudiendo crear subgrupos de comparación en función del polifenol utilizado en el estudio (Figura 46). Se han agrupado los estudios por subgrupos de polifenoles de la uva, para mostrar de manera independiente los resultados. Los subgrupos engloban estudios que utilizan resveratrol, quercetina y viniferina respectivamente y un subgrupo denominado "otros", que abarca los resultados de estudios individuales con otros polifenoles de uva diferentes a los mencionados anteriormente: apigenina, miricetrina, delfinidina, kaempferol, petunidina, malavidina, pterostilbeno, cianidina glucósido, vineatrol y ácido elágico. El último subgrupo muestra los resultados de los estudios realizados con extractos de polifenoles de uva (GPE).

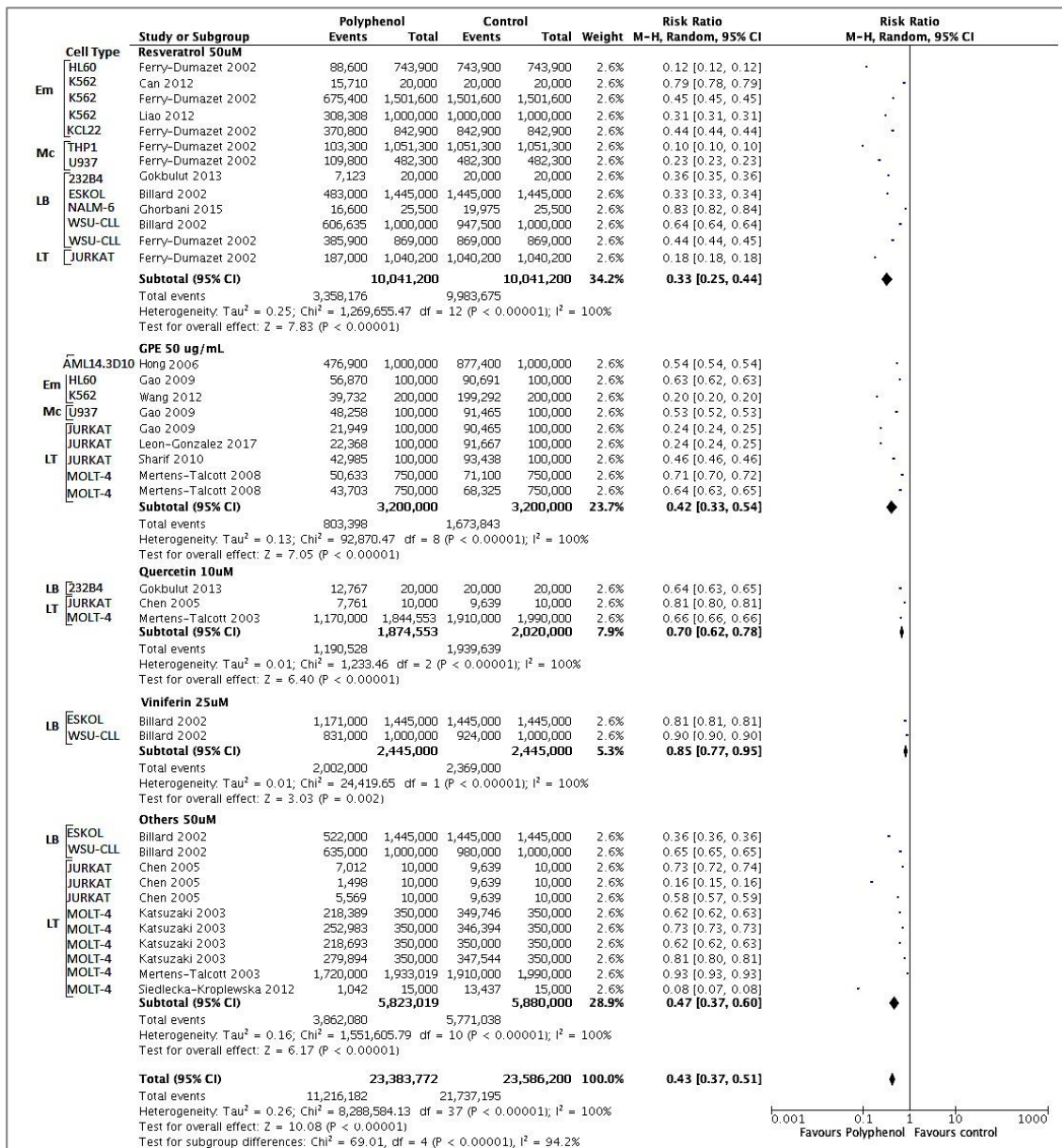


Figura 46. Resultados del meta-análisis sobre el efecto de polifenoles de uva en la proliferación de células de leucemia humana agrupados por tipo de polifenoles.

Los resultados obtenidos sobre el efecto de los polifenoles de uva en la proliferación celular mostraron que los polifenoles tienen un efecto inhibitorio del crecimiento de las células de leucemia. El resultado indica, un efecto positivo global con un valor promedio de inhibición del crecimiento del 57% (95%IC: 49%-67%). Es importante resaltar, que la heterogeneidad (I₂) obtenida a través del análisis estadístico, es muy elevada en todos los casos. El análisis de los subgrupos establecidos, nos lleva a la conclusión de que, entre los polifenoles puros analizados, el resveratrol muestra el mayor efecto frente a la proliferación celular, con una inhibición del crecimiento del 67% (95%IC: 56%-75%), El efecto de la quercetina y la viniferina también es positivo, aunque la inhibición del

crecimiento en estos casos no es tan notable, siendo de un 30%(95%IC: 22%-38%) y 15%(95%IC: 23%-5%) respectivamente. El subgrupo "otros", posee un porcentaje promedio de inhibición de crecimiento del 53% (95%IC: 40%-63%). Sin embargo, debe tenerse en cuenta la limitación de este subgrupo, ya que incluye datos de experimentos individuales realizados con diferentes polifenoles. Por último, es cierto que, cuando las células de leucemia se tratan con GPE, el porcentaje de inhibición del crecimiento es del 58% (95%IC: 46%-67%), pero en estos casos se desconoce la composición y concentración de polifenoles, por lo que este valor solo puede usarse como referencia, pero no es posible hacer una comparación individual.

4.6.4.2. Efecto de los polifenoles de uva en la proliferación de células de leucemia humanas de diferente linaje celular.

Para la comparación del resultado de proliferación celular se han utilizado los mismos criterios descritos para el *outcome 2*. Se han creado subgrupos de comparación en función del linaje celular utilizado en cada estudio (Figura 47).

Los resultados mostrados en este apartado recogen el efecto de los polifenoles de uva en la proliferación de las células de leucemia agrupadas por linaje celular. Los datos extraídos de los artículos proceden de 12 líneas celulares de leucemia que se pueden subdividir en cuatro grupos, según su linaje: derivadas de monocitos (U937 y THP1), derivadas de células mieloides tempranas (HL-60, K562, KCL22 y AML14.3D10), derivadas de linfocitos B (WSU-CLL, ESKOL, NALM-6 y 232B4) y derivadas de linfocitos T (MOLT-4 y JURKAT). Los resultados del efecto de los polifenoles se trataron de modo independiente, en función de si las células se trataron con polifenoles puros (Figura 46A) o con GPE (Figura 46B).

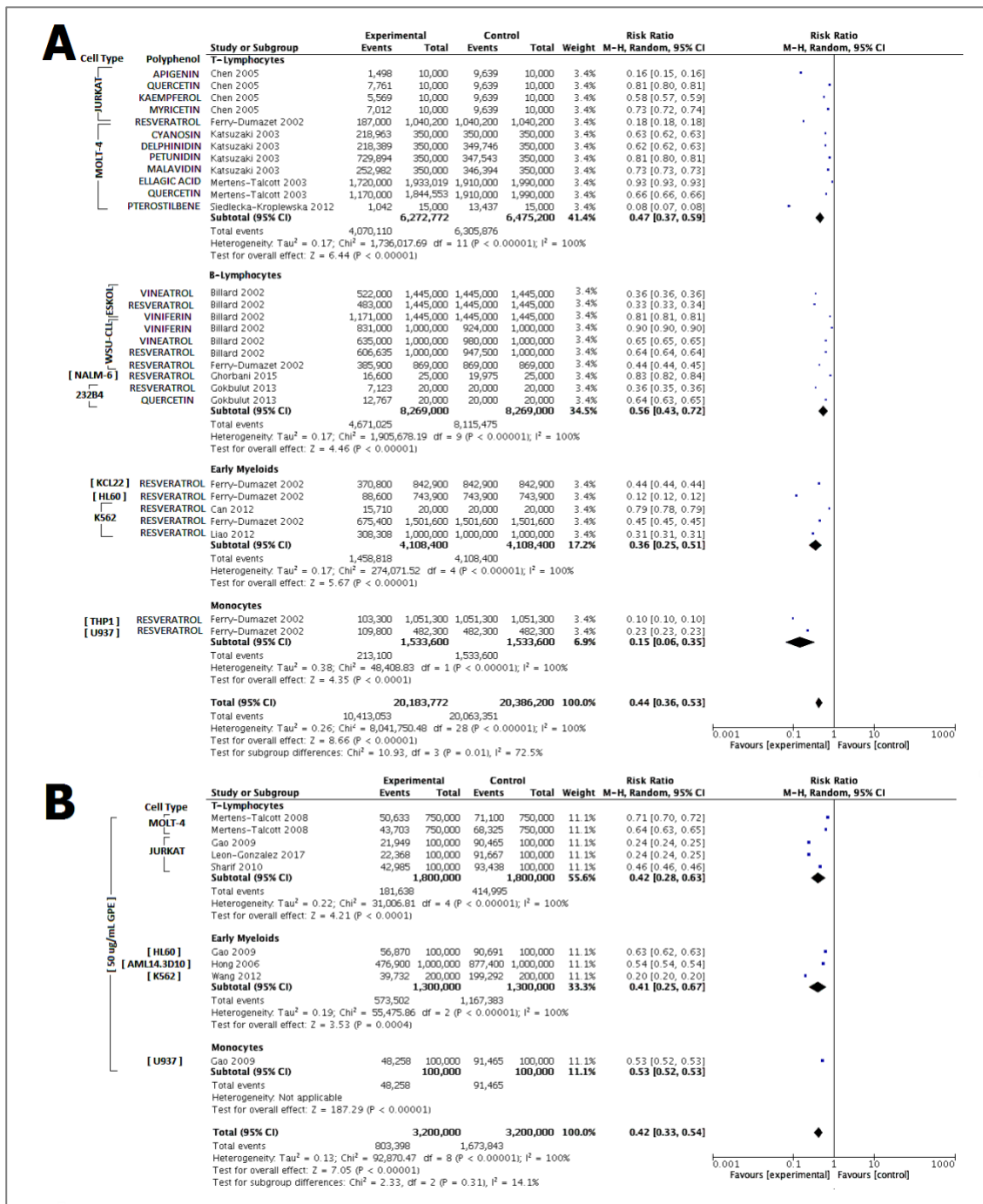


Figura 47. Resultados del meta-análisis sobre el efecto de polifenoles de uva en la proliferación de células de leucemia humana agrupadas por linaje celular. A) Tratamiento con polifenoles puros. B) Efecto del tratamiento con GPE.

El subgrupo que incluye el linaje de linfocitos T incluye el mayor número de estudios, tanto con polifenoles puros, como extractos de uva (GPE). Representan el 71% del total y, como se puede observar en la Figura 47A, los porcentajes promedio de inhibición del crecimiento debido al efecto de los polifenoles puros son 53% (95%IC: 41%-63%) y

44% (95%IC: 28%-57%) para los linfocitos T y B respectivamente. Son valores inhibitorios del crecimiento inferiores a los observados en las células mieloides tempranas (64%(95%IC: 49%-75%)) y monocitos (85%(95%IC: 65%-94%)). El porcentaje global de inhibición del crecimiento obtenido en este resultado, cuando las células de fueron tratadas con polifenoles puros es del 56%(95%IC: 47%-64%) (Figura 47A), muy similar al valor obtenido cuando los tratamientos se realizaron con GPE de diferentes orígenes y composición, 58%(95%IC: 46%-67%) (Figura 47B). Por otro lado, el porcentaje de inhibición es de un 36% (95%IC: 35%-37%) cuando se utilizan los extractos de polifenoles en células MOLT-4, y es de un 76%(95%IC: 75%-76%) de inhibición de crecimiento de células JURKAT cuando se utiliza orujo de uva extractos a 365 mg/g GAE o extractos comerciales de semillas de uva, ricos en proantocianidinas (Figura 47B).

Es importante destacar, que las células JURKAT son más sensibles al efecto inhibitorio producido por los polifenoles, resaltando el efecto de la apigenina y el resveratrol, con porcentajes de inhibición del crecimiento del 84% (95%IC: 84%-85%) y 82%(95%IC: 82%-82%) respectivamente. Con respecto a las células MOLT-4, los datos de inhibición son muy similares en todos los casos en promedio 27%(95%IC: 24%-30%), excepto para el tratamiento con pterostilbeno que resultó en una inhibición del crecimiento del 92% (95%IC: 92%-93%), muy distinto al valor medio de inhibición en estas células (Figura 47A).

De los cuatro subgrupos estudiados, los linfocitos B son las más resistentes al efecto antiproliferativo inducido por los polifenoles de la uva. En las cuatro líneas celulares derivadas de linfocitos B, se obtuvo un valor promedio de 44%(95%IC: 28%-57%) de inhibición del crecimiento tras la exposición a polifenoles, que oscila entre 10%(95%IC: 10%-10%) para viniferina y 67%(95%IC: 66%-67%) para resveratrol. Se incluyen datos obtenidos utilizando cuatro polifenoles diferentes, todos ellos pertenecientes a la familia de los polifenoles de estilbenos, excepto la quercetina. Se utilizaron cuatro líneas celulares, siendo WSU-CLL la más estudiada. En general, se observaron resultados similares en la proliferación celular independientemente del polifenol o la línea celular estudiada. Es importante mencionar, que la viniferina ejerce poca inhibición sobre el crecimiento de las células ESKOL (19%(95%IC: 19%-19%)) y WSU-CLL (10%(95%IC: 10%-10%)) y el resveratrol solo inhibe el crecimiento de las células NALM-6 en un 17%(95%IC: 16%-18%). El efecto del resveratrol en otras líneas celulares derivadas de los linfocitos B es significativamente mayor, con porcentajes promedio de inhibición del

crecimiento del 67%(95%IC: 66%-67%), 36%(95%IC: 36%-36%) y 64%(95%IC: 63%-65%) para las células ESKOL, WSU-CLLy 232B4 respectivamente. Teniendo en cuenta todos los datos indican que estas células son ligeramente menos sensibles al efecto de los polifenoles de uva que las líneas celulares derivadas de los linfocitos T.

El subgrupo de líneas celulares de leucemia derivadas de células mieloides tempranas, incluye cinco estudios realizados con tres líneas celulares diferentes (HL-60, KCL22 y K562) y resveratrol. Cabe destacar la alta variabilidad en la tasa de inhibición del crecimiento obtenida con resveratrol en estas líneas celulares, siendo de un 88%(95%IC: 88%-88%) para las células HL-60, de un 56%(95%IC: 56%-56%) para KCL22 y oscila entre 21%(95%IC: 21%-22%) y 69%(95%IC: 69%-69%) para K562 (Figura 47A). En general, estos datos llevan a inferir que estas células son relativamente sensibles al efecto de los polifenoles. Sin embargo, se puede ver una alta variabilidad en el efecto inducido por un compuesto específico en la misma línea celular (K562) en función de la publicación escogida. En comparación con el tratamiento con GPE, el porcentaje de inhibición promedio es menor (59%(95%IC: 33%-75%)) con un intervalo de efecto más amplio (IC95: 33-75%) (Figura 47B). En este caso, las tres intervenciones incluidas se realizaron empleando extractos comerciales de polifenoles de composición desconocida, lo que dificulta la obtención de conclusiones fiables. En las células K562, se observa un efecto inhibitor mucho mayor cuando se trata con GPE (80%(95%IC: 80%-80%)) que con resveratrol (48%(95%IC: 48%-48%)). Esto podría explicarse por la presencia de otros compuestos polifenólicos en el extracto, con un claro efecto antiproliferativo en este tipo de células al utilizar los extractos de polifenoles de uva.

En el último subgrupo analizado, solo hay disponibles tres estudios de dos líneas celulares derivadas de monocitos, tratadas con resveratrol y GPE. El resultado del meta-análisis indica que estas células de leucemia experimentan, cuando son tratadas con resveratrol, una inhibición promedio del crecimiento del 85%(95%IC: 65%-94%). Sin embargo, solo se incluyen dos valores de proliferación en este subgrupo, con un intervalo que varía del 77%(95%IC: 87%-87%) al 90%(95%IC: 90%-90%) (Figura 47A). El único estudio realizado con este tipo de células con GPE muestra un porcentaje de inhibición del crecimiento del 47%(95%IC: 47%-48%) (Figura 47B), mucho más bajo que el efecto del resveratrol.

La comparación de los datos en los cuatro subgrupos analizados, nos ha llevado a la conclusión de que, el efecto anti proliferativo de los polifenoles estudiados en las líneas de leucemia derivadas de los linfocitos T y B, es menor que en las líneas derivadas de las células mieloides y los monocitos tempranos. No obstante, debe considerarse que los resultados indican que existe una gran heterogeneidad entre los datos analizados, lo que puede explicarse por el tipo de estudios evaluados, dada la variedad de líneas celulares y polifenoles utilizados en los experimentos. En base a estos hallazgos, se ha concluido que es mejor organizar los datos por linaje celular, en lugar de por polifenol, para poder ver un efecto más claro de estos compuestos en la proliferación celular.

4.6.4.3. Efecto de los polifenoles de uva en el arresto del ciclo celular en las células de leucemia.

Existe una gran variabilidad de objetivos y técnicas utilizadas para evaluar la muerte celular y la inhibición del crecimiento de las células de leucemia en los artículos incluidos en este meta-análisis. Sin embargo, solamente ocho artículos muestran datos cuantitativos relacionados con la parada del ciclo celular en la fase G₀ después del tratamiento con polifenoles de uva. Para ello, se utilizaron datos de experimentos realizados con cuatro polifenoles de uva: resveratrol (50µM, 24 h), quercetina (10µM, 48 h), ácido elágico (10µM, 48 h) y pterostilbeno (44µM, 48 h). También se incluyeron cinco experimentos realizados con GPE (100µg/mL, 24h). Se ha buscado analizar el mecanismo inhibición de la proliferación celular. Para cuantificar el resultado del análisis de la etapa del ciclo celular, se han referenciado los resultados al porcentaje de células en fase G₀/G₁; que indica parada del ciclo celular; etapa previa a la inducción de apoptosis (Figura 48).

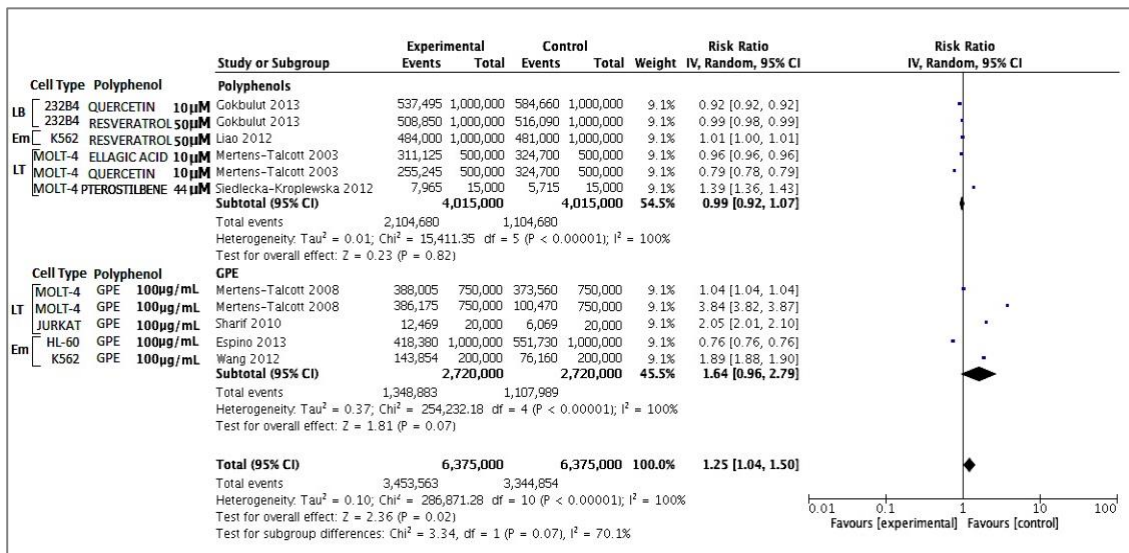


Figura 48. Resultados del meta-análisis sobre el efecto de polifenoles de uva en la detención del ciclo celular G₀ en células de leucemia.

Los resultados obtenidos muestran que cuatro de los seis datos de polifenoles puros no tienen ningún efecto en la parada del ciclo celular ya que el efecto observado fue de un 1% (95%IC: -7%-8%). En cambio, cuando se probó el pterostilbeno (44µM) en células MOLT-4, se encontró el efecto contrario al que se esperaba, es decir, induce la división celular. Solo hay una intervención positiva, realizada con quercetina (10µM), que muestra la inducción de la detención del ciclo celular en la fase G₀ cuando se usan células MOLT-4. Además, la quercetina (10µM) muestra un pequeño efecto positivo en las células 232B4, mientras que el resveratrol (50µM), no muestra ningún efecto en la detención del ciclo celular, ya sea en las células 232B4 o K562. Por tanto, no se pudo concluir que existe una detención del ciclo celular de las células de leucemia en fase G₀ por causa de los cuatro polifenoles de uva estudiados.

El segundo subgrupo considera los datos de los experimentos realizados usando GPE en líneas celulares de leucemia derivadas de células mieloides tempranas y linfocitos T. Como se puede ver en la Figura 48, no hay un efecto directo entre la concentración de GPE analizada y la parada del ciclo celular en este tipo de células. La inducción de la detención del ciclo celular en la fase G₀ solo se observó una vez en el estudio realizado con células HL-60 tratadas con extractos de semilla de uva Tempranillo a 6160±160mg/L GAE. Por el contrario, el resto de los estudios indican el efecto contrario, estimulando la progresión del ciclo celular.

4.6.4.4. Estudio de los mecanismos de inducción de apoptosis en líneas celulares de leucemia por efecto de los polifenoles de uva.

La apoptosis, es un proceso biológico complejo de muerte celular programada, y las rutas metabólicas, que se activan son múltiples. De todas rutas metabólicas relacionadas con la apoptosis las más comunes fueron: la vía de activación de apoptosis mediante caspasas 3 y 7, fue estudiada en 13 artículos distintos, la vía de apoptosis temprana es mencionada en 9 artículos, el estudio de la actividad mitocondrial mencionada en 6, y el estudio de la expresión de la proteína p53, que es cuantificada en 3 artículos.

Además de los tres resultados ya mencionados, hubo un último *outcome* considerado dentro del presente meta-análisis. Consistía en la comparación de los mecanismos metabólicos de inducción de apoptosis, en las líneas celulares de la leucemia humana, mediante el empleo de diferentes polifenoles. Se quería analizar cuantitativamente la ruta metabólica de apoptosis que se activaba, en las líneas celulares de leucemia, al verse modificadas en su crecimiento al ser tratadas con los distintos polifenoles. Se estudiaron otros parámetros distintos a la proliferación celular, como la inducción de la apoptosis y con la viabilidad celular. Al extraer los datos de los artículos seleccionados, se detectó una gran heterogeneidad en la forma de presentar los datos, así como el modo de diseñar los estudios para la evaluación de dichas rutas apoptóticas, pero no se ha realizado siguiendo ninguna de las categorías descritas (Tabla III Anexos), debido a la heterogeneidad de los datos y la forma experimental de abordarlo en cada uno de los artículos, que era distinta. En los estudios se utilizan diferentes compuestos, en concentraciones variadas, utilizando metodologías distintas para determinar el arresto del ciclo celular, o la inducción de apoptosis.

Todos los resultados en su conjunto, muestran en este estudio, que los polifenoles de uva tienen un efecto perjudicial (positivo) en el crecimiento de las células de leucemia *in vitro*. Se puede afirmar que el tratamiento de la leucemia con polifenoles puede llegar a ser beneficioso; pudiéndose concluir en la posibilidad de ser utilizados como coadyuvantes en el tratamiento de pacientes con leucemia. Los resultados sugieren, que los polifenoles utilizados en experimentos realizados, en las distintas líneas celulares de

leucemia, muestran una inhibición de la proliferación de dichas células tumorales por causa de los polifenoles. El grado o magnitud de este efecto depende de la fuente de las líneas celulares y del polifenol específico o GPE utilizado, siendo las líneas de linfocitos más resistentes al efecto antiproliferativo de los polifenoles estudiados, que las líneas mieloides tempranas o monocíticas. Sin embargo, no se ha podido determinar la vía metabólica concreta mediante la cual sucede la inhibición de dicho crecimiento.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES



5. Discusión.

España es uno de los países con mayor tradición vitivinícola del mundo, habiendo cultivo de vid en todas las Comunidades Autónomas. Castilla-La Mancha es la región con la mayor extensión cultivada^{9, 11}, y junto con la Rioja y la Ribera del Duero, son los territorios más especializados en la producción de uva de todo el país ². Las variedades de uva que más destacan en España, por extensión de cultivo, son Airén para las variedades de uva blanca y Tempranillo para las variedades de uva tinta^{9, 11}. La variedad de Tempranillo se utiliza principalmente para la elaboración de vino tinto de distintas denominaciones de origen¹⁸. Airén se ha utilizado principalmente para la elaboración de vinos blancos de denominación de origen La Mancha^{20, 22} y también para la obtención de mosto concentrado que además de su uso en la chaptalización tiene numerosas aplicaciones en industria alimentaria. Este uso del mosto en la producción de alimentos de consumo preferente en población infantil y deportistas ha motivado este estudio. El objetivo es caracterizar el contenido en polifenoles del mosto Airén por ser el mosto que más se utiliza y comercializa como mosto concentrado para su adición en este tipo de alimentos. Es sabido que los polifenoles son compuestos bioactivos beneficiosos para la salud por su capacidad antioxidante y antimicrobiana ^{22, 24, 39}, de ahí que también se haya realizado una revisión sistemática y meta-análisis para determinar el efecto de los polifenoles de la uva en la leucemia. Estos compuestos podrían ser potentes nutraceuticos en la prevención o el tratamiento de la leucemia, un tipo de cáncer que afecta en gran medida a población infantil.

Caracterización del contenido en polifenoles del mosto Airén y comparación con mostos de otros varietales.

Para caracterizar los polifenoles del mosto Airén se puso a punto un procedimiento de extracción de polifenoles con metanol a partir de muestras de mosto liofilizadas. Se ha determinado que el proceso conlleva una pérdida de polifenoles que oscila entre el 33% en mosto Tempranillo y el 15% en el mosto Airén. Estos datos indican que el método de extracción utilizado tiene una eficiencia bastante buena, ya que la cuantificación se ha hecho mediante espectrofotometría y en el mosto hay moléculas que no son polifenoles y absorben luz a 280nm, por lo que el porcentaje de pérdida durante la extracción sería algo menor de lo estimado.

El extracto de Tempranillo es el más rico en polifenoles (1.094,17 mg/L GAE), algo esperable ya que está ampliamente descrito que las variedades tintas son más ricas en estos compuestos que las variedades blancas^{29, 96, 264}. Si nos centramos en las variedades blancas, los resultados indican que la variedad Airén (638,86 mg/L GAE) tiene una concentración de polifenoles totales ligeramente superior (7,5%) a la del mosto Sauvignon blanc (590,75 mg/L GAE) y un 29% mayor que la del mosto Verdejo (453,78 mg/L GAE). El extracto de la variedad Gewürztraminer es el que tiene el mayor contenido en polifenoles de todas las variedades blancas (909,5 mg/L GAE), lo que supone un 29% más que Airén.

En cuanto a la capacidad antioxidante de los mostos se puede decir que la pérdida de polifenoles asociada al proceso de extracción afecta de manera proporcional a la capacidad antioxidante de los extractos. De modo general estos resultados indican que cuanto mayor es la concentración de polifenoles mayor es la capacidad antioxidante de los extractos, algo que se ha mostrado en estudios previos con estas y otras variedades de uva^{98, 99, 265}. El mosto Tempranillo es el que tiene la mayor capacidad antioxidante (1,35 mg/gDPPH), seguido de la variedad Gewürztraminer (1,78 mg/gDPPH), Sauvignon Blanc (2,36mg/g DPPH), Airén (2,43 mg/g DPPH) y por último Verdejo (2,82 mg/gDPPH). En los extractos se sigue el mismo patrón, siendo Tempranillo el que posee la mayor capacidad antioxidante (1,85 mg/gDPPH), seguido de Gewürztraminer (2,14 mg/gDPPH), Sauvignon Blanc (2,75 mg/g DPPH), Airén (2,82 mg/g DPPH) y por último Verdejo (3,21 mg/gDPPH). Cabe destacar la mayor capacidad antioxidante detectada en el mosto y el extracto de Sauvignon blanc frente a Airén, en este caso, aunque Airén tiene una mayor concentración de polifenoles su capacidad antioxidante es menor.

A partir de datos obtenidos de la bibliografía se ha generado una base de datos de 56 polifenoles de uva, que incluye los parámetros de ionización y fraccionamiento para su análisis mediante MS. De estos compuestos, se han seleccionado 16 polifenoles representantes de las familias más habituales en mosto y vino, para realizar su cuantificación en los mostos objeto de estudio de esta tesis. En concreto se cuantificaron 3 ácidos hidroxicinámicos, 6 ácidos hidroxibenzoicos, 4 flavonoides, 2 estilbenos, y 1 hidroxycumarina.

De todos los polifenoles estudiados, la esculetina es el que se ha detectado en menor cantidad en todos los varietales, con una concentración de 2,17 mg/L en el extracto Airén. El extracto en el que más cantidad se ha registrado es Gewürztraminer (2,21 mg/L) y la menor concentración se ha detectado en Tempranillo (2,16 mg/L).

En cuanto a los ácidos hidroxicinámicos, el ácido cumárico únicamente se detectó en los extractos de mosto Airén (2,85 mg/L) y Verdejo (2,93 mg/L). El ácido cafeico no se detectó en el extracto Sauvignon blanc y en los extractos de los otros cuatro varietales su concentración es muy similar y no muestran diferencias relevantes entre los distintos varietales: 2,56 mg/L en Tempranillo, 2,54 mg/L en Airén, 2,51 mg/L en Gewürztraminer y 2,49 mg/L en Verdejo. El ácido clorogénico ha sido el único compuesto detectado en los cinco extractos, estando presente en mayor concentración en la variedad tinta Tempranillo (2,94 mg/L) que en Airén (2,79 mg/L).

En cuanto a los ácidos hidroxibenzoicos, se han detectado diferencias estadísticamente significativas en la concentración de ácido gálico en Airén (2,81 mg/L) y los varietales Gewürztraminer (3,05 mg/L) y Verdejo (3,065 mg/L), con incrementos de un 7,8% y un 9,8% respectivamente. La concentración más baja de ácido gálico se detectó en Verdejo (2,56 mg/L), un 9,8% por debajo de la registrada en Airén, que es la misma que en Tempranillo. Para los cuatro ácidos hidroxibenzoicos restantes (ácidos dihidroxibenzoico, protocatecuico, salicílico y vanílico), las concentraciones registradas en los cinco varietales de mosto de uva son muy similares y las diferencias detectadas no tienen relevancia funcional entre Airén frente al resto de varietales de mosto de uva.

De los polifenoles analizados de la familia de los estilbenos: resveratrol y polidatina, ninguno de ellos muestra grandes diferencias de concentración entre las variedades de mosto estudiados. El extracto Airén es el que más cantidad tiene de ambos polifenoles, pero las diferencias no tienen relevancia funcional (un 2% para polidatina y un 1% en resveratrol). En el extracto Sauvignon blanc, el resveratrol no se ha detectado, aunque sí se ha detectado la polidatina (3,067 mg/L), algo extraño dado que la polidatina es un precursor natural del resveratrol. Además, resulta sorprendente que la cantidad detectada de resveratrol y polidatina sea igual en mosto Airén que en Tempranillo, puesto que está descrito que los mostos y vinos tintos tienen mayor contenido en polifenoles y la mayoría de estudios publicados se centran en el resveratrol como uno de los principales responsables de la capacidad antioxidante y anticancerígena^{58, 61, 266} de

estos productos. Aunque se ha detectado la misma concentración de resveratrol en Airén que en Tempranillo, la capacidad antioxidante de este último es mayor, lo que estaría indicando la importancia de otros polifenoles del mosto en la capacidad antioxidante total de los extractos.

Los polifenoles del grupo de los flavonoides son los que han mostrado más variabilidad en los diferentes mostos. En el extracto Airén destacan los 6,3 mg/L detectados de catequina, que supone un 33,3% más que la cantidad presente en Gewürztraminer (4,2 mg/L), un 50% más que la detectada en Verdejo (3,05 mg/L) y el triple de la concentración presente en Sauvignon blanc (1,91 mg/L). Además, también supera en un 42% la concentración de catequina detectada en Tempranillo (3,6 mg/L). También hay que destacar la cantidad de quercetina detectada en Airén (5,8 mg/L), que es similar a la de Gewürztraminer (6 mg/L) y bastante superior a la presente en los extractos de Sauvignon blanc (3,5 mg/L) y Verdejo (4,37 mg/L). La quercetina detectada en Tempranillo (3,6 mg/L) es muy similar a la presente en Sauvignon blanc y es un 40% menor que la detectada en Airén. Estos resultados constituyen la principal diferencia en cuanto al contenido en polifenoles en el mosto Airén frente al resto de variedades estudiadas. Las diferencias en las concentraciones registradas son estadísticamente significativas y tienen relevancia funcional según el criterio *fold of change* aplicado.

Estos datos son muy interesantes puesto que hay numerosos estudios que describen la capacidad anticancerígena de la quercetina y su implicación en la modulación de las vías de señalización y la expresión de micro RNAs implicados en el desarrollo y la progresión de las células tumorales^{144, 267, 268}. Además, se también se ha probado su actividad anticancerígena en diferentes líneas celulares de leucemia interfiriendo en el ciclo celular e induciendo apoptosis²⁶⁹⁻²⁷¹. Sobre catequina hay menos estudios realizados, si bien es cierto que se le considera un compuesto bioactivo con capacidad antioxidante y antimicrobiana^{272, 273}. Estos dos flavonoides se han utilizado en muchos estudios y se ha descrito que poseen propiedades anticancerígenas ²⁷⁴⁻²⁷⁶, induciendo las rutas de apoptosis en células cancerosas, además de sus propiedades antioxidantes que sirven para neutralizar las especies reactivas de oxígeno (ROS) libres en las células, lo que proporciona beneficios para la salud^{277, 278}. Se ha estudiado también frente a enfermedades como aterosclerosis¹⁶⁷ o frente a enfermedades cardiovasculares²⁷⁹, procesos inflamatorios²⁸⁰, e incluso como un importante regulador de la formación muscular²⁸¹.

La epicatequina destaca en Gewürztraminer (3,33 mg/L), con una concentración un 16,7% superior a la detectada en Airén (2,77 mg/L) y superior al 30% con respecto a la detectada en las otras tres variedades: Sauvignon blanc (2,03 mg/L), Verdejo (2,2 mg/L) y Tempranillo (2,48 mg/L). En cuanto a isorhamnetina, no hay diferencias relevantes entre las distintas variedades estudiadas.

La comparación del perfil polifenólico global obtenido con los 15 compuestos cuantificados en los extractos de mosto estudiados indican que el perfil de polifenoles de la variedad Airén es muy similar al resto de variedades blancas estudiadas. Cabe destacar que los mostos Airén y Gewürztraminer muestran diferencias destacables en la concentración de los flavonoides quercetina y catequina. De las cuatro variedades blancas estudiadas, Sauvignon blanc es la que presenta el perfil polifenólico más pobre y sorprende el perfil obtenido de la variedad Tempranillo puesto que no destaca en ninguno de los polifenoles estudiados. Sin embargo, el mosto Tempranillo es el que muestra la mayor capacidad antioxidante; y Gewürztraminer y Sauvignon blanc también tienen mayor capacidad antioxidante que Airén. Esto indicaría que el mosto es una matriz muy compleja que además de los polifenoles analizados en este trabajo, tiene muchos otros polifenoles que son importantes antioxidantes que no hemos podido cuantificar.

Los resultados de cuantificación de polifenoles, analizados en las distintas variedades de mosto, son coherentes a los resultados obtenidos por espectrofotometría. El único comportamiento que se desvía es Tempranillo ya que tiene la mayor concentración de polifenoles totales expresados en equivalentes de ácido gálico y las concentraciones de los polifenoles individuales analizados son menores que las registradas en variedades blancas. Es bien sabido que Tempranillo es una variedad muy rica polifenoles, si bien es cierto que muchos de ellos no se han podido identificar ni cuantificar en el estudio HPLC-MS realizado en este trabajo, además de otros que posiblemente por su polaridad no se hayan solubilizado durante el proceso de extracción^{18, 68}. Posiblemente, los polifenoles no extraídos pertenezcan a las familias de antocianos, antocianinas o flavonas que no hemos podido identificar. Dichos polifenoles son característicos de la coloración de las variedades tintas^{18, 28, 68}, y son compuestos más apolares que los identificados, por lo que el metanol, utilizando el procedimiento descrito, no ha logrado extraerlos de la matriz liofilizada. Estas diferencias sugieren que el proceso de extracción y cuantificación de polifenoles desarrollado no refleja la complejidad polifenólica de las variedades de uvas tinta y blancas.

Efecto del proceso de concentración del mosto Airén en la variedad y cantidad de polifenoles.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el proceso de concentración del mosto Airén realizado en la empresa Mostos Españoles S. A. conlleva una reducción en el contenido en polifenoles, a excepción de la quercetina, entre el 38,37%-69,6% que llega a ser del 57,7%-70% en el caso del mosto concentrado decolorado. El proceso de concentración se basa en la evaporación de agua del mosto por efecto del calor, algo que muy probablemente afecta a la estabilidad y solubilidad de estos compuestos. En el caso del mosto decolorado, el paso de filtración previo a la concentración que se realiza para eliminar los compuestos responsables del color del mosto, además de minerales e iones como el hierro, magnesio, calcio o potasio, también afecta negativamente al contenido en polifenoles ^{282, 283}.

Los resultados obtenidos con las muestras del mosto concentrado normal (MCN) indican que como se había determinado anteriormente, los flavonoides catequina y quercetina destacan por encima del resto. Los incrementos en la concentración de la mayoría de los polifenoles entre las etapas final e inicial son inferiores a los valores teóricos calculados en base al factor de concentración de azúcares. En el caso de los ácidos fenólicos, el porcentaje de pérdida por efecto del proceso industrial de concentración es significativa: ácido cumárico (51%), dihidroxibenzoico (62,4%), gálico (52,6%), protocatecuico (61,4%), cafeico (67,5%), clorogénico (69,5), ferúlico (71,64%), salicílico (69,4%) y vanílico (70,34%). En el caso de los estilbenos las pérdidas son el 69,6% para resveratrol y el 67,6% para polidatina. Y en la familia de los flavonoides la pérdida de epicatequina ha sido de un 49,3% y la de catequina un 38,4%, además, no se ha podido calcular la pérdida de isorhamnetina al no haber sido identificada en la etapa inicial.

Hay que destacar el caso de la quercetina por ser el único polifenol que no se pierde en el proceso de concentración, de hecho, algo que sorprende es que la concentración de este polifenol en el mosto concentrado (MCNf) es el doble de la que cabría esperar si no hubiera ninguna pérdida del compuesto. Esto se podría explicar asumiendo que en la muestra inicial una parte importante de la quercetina estuviera glucosilada²⁸⁴ y por ello no se hubiera cuantificado adecuadamente con el método empleado. La glicosilación de los flavonoides es algo frecuente y conocido que afecta a su solubilidad, estabilidad y

bioaccesibilidad²⁸⁵. Si esto es así, el calor al que el mosto es sometido durante el proceso de concentración podría eliminar esta modificación y permitir la cuantificación del compuesto en la muestra final ya que las condiciones de ionización y fragmentación de la espectrometría de masas están optimizadas para cuantificar la quercetina libre. No obstante, este mismo efecto es el que serviría para justificar la pérdida del resto de polifenoles durante el proceso de concentración. El calentamiento al que se somete el mosto para que tenga lugar la evaporación del agua durante la concentración, es muy probable que afecte a la estructura de los polifenoles de modo parecido a lo que ocurre con los alimentos cuando son cocinados²⁸⁶ y en algunos casos estos cambios podrían provocar su degradación, modificación, agregación, etc.

Este hecho estaría respaldado por la pérdida de polifenoles totales que se ha detectado en el mosto concentrado que es de un 40%, pasando de 431,53mg/L GAE en el mosto inicial a 873,81mg/L en el MCNf (valor esperado 1.467,2 mg/L). Sí que es cierto que se observa un incremento de la capacidad antioxidante de los mostos concentrados, pasando de 2,61mg/g DPPH en el MCNi a 1,25 mg/g DPPH el MCNf, pero en este caso es difícil establecer la comparativa con lo esperado porque los valores IC₅₀ se obtienen a partir de curvas sigmoidales. Por tanto, se puede concluir que el proceso industrial de concentración de mosto Airén afecta negativamente al contenido en polifenoles y a su capacidad antioxidante.

En el caso del MCD la pérdida de polifenoles totales asociada al proceso de concentración es del 56% y su capacidad antioxidante pasa de un valor de 3,06mg/g DPPH en el MCDi a 2,24 mg/g DPPH en el MCDf. En relación a la cuantificación de los polifenoles individuales en el MCD realizada mediante MS, los resultados son muy similares a los obtenidos con las muestras del mosto concentrado normal (MCN) detectándose pérdida de todos los polifenoles identificados en la muestra concentrada final. En este caso, la pérdida de flavonoides es mayor que en el mosto concentrado normal, pero menor que las pérdidas registradas del resto de polifenoles estudiados. En el caso de la epicatequina, la pérdida es de un 67,82%, la de catequina un 57,74% y la de quercetina un 44,9%. El por qué en este caso hay una pérdida de quercetina similar a la detectada en el resto de los polifenoles y no ocurre lo mismo que en el caso del MCN en el que se detecta más catequina de la teórica no es fácil de explicar. En este caso el mosto fresco Airén se somete a un proceso de ultrafiltración previo a la concentración para la su decoloración, este paso podría eliminar las moléculas derivadas

de catequina (glucosiladas) que hemos postulado como responsables de la elevada concentración de este polifenol en las muestras de MCNf. En el caso de los ácidos fenólicos, el ácido gálico ha sido el que menos pérdida ha registrado con un 64,2%, con respecto a la concentración teórica esperada. En el grupo de los estilbenos, se ha perdido un 70% tanto de polidatina como de resveratrol.

Todos estos resultados muestran que el proceso de concentración de mosto conlleva una pérdida de polifenoles, ya que las concentraciones que se registran de estos compuestos en el mosto concentrado no son proporcionales al factor de concentración de azúcares. Hay que destacar que el proceso de ultrafiltración para la obtención del mosto concentrado decolorado frente al normal conlleva una pérdida de polifenoles totales de un entre un en el mosto fresco Airén, que se traduce en una diferencia que oscila entre un 1% para los ácidos fenólicos y un 18% para los flavonoides menos en el MCD frente al MCN. Además, al comparar la concentración de polifenoles totales en las muestras de mosto iniciales del proceso de concentración (MCDi =348,4mg/L GAE y MCNi=431,5mg/L GAE) con la del mosto fresco Airén (638,86mg/L GAE), se observa una disminución media en un 40%. Este dato indica que las condiciones de almacenamiento del mosto (90 días con sulfuroso a 880 ppm) afectan negativamente a los polifenoles, lo que está de acuerdo con otros estudios que indican que los polifenoles se degradan con el paso del tiempo^{68, 287, 288}. no obstante, sí que muestran que el mosto concentrado final, tanto normal (MCN) como el decolorado (MCD) sí que muestran polifenoles, con lo que hacen de esta bebida, un alimento con contenido polifenólico, con la implicación beneficiosa para la salud que significa. Por todos estos resultados, el mosto, como el vino y otros productos derivados de la uva, contiene polifenoles beneficiosos para la salud, siendo además un alimento con relevancia funcional para ser consumido de manera directa, como complemento en otros alimentos, o siendo la base de la producción de vinos ^{22, 24, 38, 101}.

No obstante, hay polifenoles en los dos tipos de mosto concentrado, por lo que al incluir este producto en la formulación de cualquier alimento se está añadiendo una pequeña cantidad de estos antioxidantes naturales que son objeto de numerosos estudios por sus efectos antiinflamatorios, anticancerígenos, antimicrobianos, antienvjecimiento, cardioprotectores, etc^{65, 75, 114, 289, 290}.

Efecto de los polifenoles de uva en la proliferación de células de leucemia humanas.

Una vez analizado el contenido en polifenoles del mosto Airén y el efecto que en ellos tiene el proceso de concentración, nos planeamos terminar el trabajo dando respuesta a la pregunta de si los polifenoles de uva son efectivos para tratar y prevenir una enfermedad como la leucemia. La leucemia es una enfermedad más frecuente en niños que en adultos que engloba muchos tipos diferentes de cáncer, siendo la leucemia linfocítica aguda (LLA) la que presenta el mayor número de casos de leucemia pediátrica (78%)¹⁵¹. Este fue el motivo de realizar este estudio, ya que el mosto de uva es un componente base en muchos productos de alimentación infantil y los polifenoles son compuestos bioactivos antioxidantes que han demostrado tener actividad antiproliferativa en muchos tipos de células tumorales ²⁹¹.

El resultado de la revisión sistemática y el meta-análisis realizado indicaron que los polifenoles de uva tienen un efecto antiproliferativo sobre las células de leucemia humanas cultivadas *in vitro*, si bien es cierto que el tamaño del efecto depende del polifenol y la línea celular estudiada. Este resultado se ha obtenido a partir de los artículos científicos publicados en los últimos 15 años sobre polifenoles de uva y leucemia. El estudio se hizo con datos experimentales obtenidos con líneas celulares de leucemia humana cultivadas *in vitro*^{171, 292} porque no existen datos de ensayos clínicos realizados con polifenoles en enfermos de leucemia. El análisis de los datos se hizo siguiendo la metodología descrita por Cochrane, siguiendo el manual y la guía PRISMA^{182, 184, 185}. El riesgo de sesgo, no se evaluó a pesar de la alta heterogeneidad, porque los datos incluidos en el meta-análisis fueron todos extraídos directamente de los artículos incluidos en el estudio, todos ellos procedentes de revistas indexadas sometidos a estrictos controles de calidad y revisados por pares. Se incluyeron datos de 17 estudios realizados con 12 líneas celulares de diferente origen.

El primer objetivo del estudio fue determinar el efecto de los polifenoles de uva en la proliferación de las células de leucemia. El resultado del meta-análisis indica un efecto positivo global con un valor promedio de inhibición del crecimiento del 57% (95%IC: 49%-63%). El análisis de los subgrupos establecidos por tipo de polifenol, lleva a la conclusión, de que, el resveratrol es el compuesto con el mayor efecto antiproliferativo, con una inhibición del crecimiento del 67% (95%IC: 56%-75%). Este resultado está de

acuerdo con otros que indican que el resveratrol podría ser un buen compuesto bioactivo, tanto para la prevención como para su uso terapéutico contra diferentes tipos de cáncer [61, 151]. El efecto de la quercetina y la viniferina también es positivo, pero la inhibición media del crecimiento es del 30% (95%IC: 22%-38%) y 15% (95%IC: 5%-23%) respectivamente. Cabe señalar que el número de estudios, incluidos en el estudio que usan resveratrol, es mucho mayor que los estudios realizados con otros polifenoles.

Es interesante el efecto del subgrupo que incluye otros polifenoles de uva, que da como resultado una inhibición del crecimiento del 53% (95%IC: 40%-63%), más cercano al efecto del resveratrol que al de la quercetina y la viniferina. Este subgrupo incluye datos provenientes de experimentos individuales realizados con diferentes polifenoles en líneas celulares de leucemia de varios linajes, por lo que existe una gran variabilidad en el efecto. De este subgrupo hay que destacar el efecto de la apigenina (flavonoide) y el pterostilbeno (estilbeno) en las células JURKAT y MOLT-4, ambas líneas de leucemia linfoblástica aguda derivadas de linfocitos T, que inhiben el crecimiento celular un 84% y 92% respectivamente. La apigenina se ha propuesto como un agente natural anticancerígeno interesante, que promueve la apoptosis mediante la activación de vías extrínsecas dependientes de caspasa en células cancerosas de diferentes orígenes ^{80, 81, 293}. Por otro lado, el pterostilbeno se ha demostrado que interfiere con las rutas metabólicas directamente relacionadas con la senescencia y la inducción de apoptosis en las células tumorales ^{60, 294}.

Según el número de estudios meta-analizados, el segundo tratamiento más importante fue el realizado con 50µg/ml de GPE. La inhibición del crecimiento en este caso es del 58% (95%IC: 46%-67%), menor que el 67% (95%IC: 56%-75%) obtenido con resveratrol a 50µM. La interpretación de estos datos es difícil porque se desconoce la composición específica de polifenoles de los GPE utilizados. Sin embargo, estos resultados apoyarían la hipótesis de que una combinación de polifenoles naturales en lugar de un solo compuesto puede ser más efectivo¹²⁵. Este es un punto importante considerando que los GPE usados en los estudios tienen diferentes orígenes y composición de polifenoles, sin embargo, solo se analizaron seis líneas celulares diferentes en contraste con las diez líneas usadas con resveratrol. De hecho, no se dispone de datos procedentes de células de leucemia derivadas de linfocitos B.

Los resultados en su conjunto muestran que el valor más alto de inhibición del crecimiento es del 67% (95%IC: 56%-75%) obtenido tras la exposición a resveratrol 50µM seguido del 53% (95%IC: 40%-63%) obtenido con el grupo de otros polifenoles usados a la misma concentración final. Es cierto que cuando se tratan células con GPE el porcentaje de inhibición del crecimiento es del 58% (95%IC: 36%-67%), pero en estos casos se desconoce la composición y concentración de polifenoles, por lo que este valor solo se puede utilizar como referencia, pero no es posible realizar una comparación individual.

El análisis del efecto de los polifenoles de uva en las células de leucemia agrupadas por linaje celular (resultado 2), indican un efecto antiproliferativo de estos compuestos, independientemente de su origen celular. Los valores medios de inhibición del crecimiento son 56% (95%IC: 47%-64%) con polifenoles puros y 58% (95%IC: 37%-72%) con extractos de polifenoles (GPE). El subgrupo que incluye el linaje de linfocitos T incluye el mayor número de estudios con un valor promedio de 53% (95%IC: 41%-63%) de inhibición del crecimiento. Es importante destacar que hay tres polifenoles que producen valores sobresalientes de inhibición del crecimiento, apigenina en las células JURKAT y los estilbenos: resveratrol y pterostilbeno, en las células MOLT-4. En las cuatro líneas celulares derivadas de linfocitos B, se obtuvo el valor más bajo de inhibición del crecimiento, 44% (95%IC: 28%-57%), lo que indica que las células derivadas de linfocitos B son las más resistentes al efecto antiproliferativo inducido por los polifenoles de uva. El tercer subgrupo incluye líneas celulares derivadas de células mieloides tempranas y todos los experimentos se realizaron con resveratrol a 50µM. En este caso el resultado muestra una inhibición promedio del crecimiento del 64% (95%IC: 49-75%).

Analizando los datos en detalle, se podría concluir que las células promielocíticas agudas HL-60 son altamente sensibles al efecto inhibitor del resveratrol (88%(95%IC: 87-88%)), mientras que KCL22 y K562, ambas células de leucemia mieloide crónica, muestran más variabilidad en la inhibición, con porcentajes que oscilan entre el 21% y el 69%. La intervención de las células K562 con GPE enriquecido en proantocianinas, produce una inhibición del crecimiento del 80%. Existen evidencias que muestran el efecto antiproliferativo de las proantocianidinas, solas o en combinación con otros polifenoles como el resveratrol, en células de cáncer colorrectal, de próstata y mama^{77, 295, 296}. Por último, hay que destacar el subgrupo de células derivadas de monocitos que

muestra el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento, 85% (95%IC: 83-87%). En este caso, ambas son líneas monocíticas agudas y el tratamiento se realizó con resveratrol 50µM. Solamente había un resultado disponible con GPE rico en proantocianidinas que proporciona una inhibición del crecimiento del 47% en las células U937.

El resultado 3 muestra que los polifenoles tienen efectos heterogéneos con respecto a la detención del ciclo celular en las células de leucemia. Solo las intervenciones con quercetina inducirían la detención del ciclo celular en las células de leucemia derivadas de linfocitos B y T. En contraste, el resveratrol y el ácido elálgico no muestran ningún efecto y el tratamiento con pterostilbeno es opuesto a la detención del ciclo celular. Cuando las células fueron tratadas con GPE, cuatro de cada cinco observaciones no muestran ningún efecto sobre la detención del ciclo celular. Estos resultados indican que la inhibición del crecimiento promovida por los polifenoles de la uva en las células de leucemia no es un efecto directo en el arresto del ciclo celular en la fase G₀. Estos resultados nos permiten afirmar que el efecto antiproliferativo de los polifenoles en líneas celulares de leucemia derivadas de linfocitos T y B es menor que en células derivadas de células mieloides tempranas y monocitos. Además, el efecto del resveratrol en las líneas de leucemia aguda derivadas de monocitos y células mieloides es mayor que en las líneas de leucemias crónicas. Este es un aspecto importante a tener en cuenta para el desarrollo de futuros experimentos *in vitro* e *in vivo*, ya que las diferencias moleculares que afectan a las vías de señalización intracelular en función del tipo de leucemia pueden estar directamente implicadas en la eficacia del tratamiento con resveratrol u otros polifenoles.

La conclusión de este estudio de meta-análisis es que los polifenoles de uva tienen un marcado efecto antiproliferativo sobre las células de leucemia cultivadas *in vitro*. El grado o magnitud de este efecto depende de la fuente de las líneas celulares y del polifenol específico o GPE utilizado. Trabajos recientes han demostrado una actividad antiangiogénica de los extractos de polifenoles en las células cancerosas¹³⁹ y la capacidad de modular los cambios epigenéticos directamente involucrados en el desarrollo del cáncer^{297, 298}. Más específicamente, se ha demostrado que el resveratrol modula la autofagia e induce la apoptosis en las células de leucemia^{157, 299, 300}. También hay resultados obtenidos en modelos animales que permiten proponer que el consumo de polifenoles en la infancia e incluso en la dieta materna podría prevenir el desarrollo de

enfermedades crónicas en la edad adulta³⁰¹. Todos estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio que respalda el efecto antiproliferativo de los polifenoles de la uva, principalmente el resveratrol, en las células de leucemia.

Sin embargo, se necesita realizar estudios *in vivo* que permitan analizar y mejorar la biodisponibilidad de estos compuestos y su posible toxicidad o reacciones adversas con otros componentes alimentarios. Las interacciones entre los diferentes componentes presentes en los productos derivados de la uva podrían inducir efectos antagónicos, sinérgicos o aditivos, que dificultarían la diferenciación entre prevención y terapia para el tratamiento de la leucemia. Una vez que estos puntos importantes se hayan abordado y se hayan establecido los procedimientos de seguridad, se deben realizar ensayos clínicos con pacientes con leucemia para determinar si los polifenoles de uva podrían usarse como un producto natural antileucémico preventivo o terapéutico.

Todos los resultados del análisis del perfil polifenólico de los mostos de los diferentes variedades como de las etapas de concentración, indican que el mosto es una matriz rica en estos compuestos. Por lo tanto, se puede decir que el mosto es una bebida que tiene una gran diversidad de nutrientes y metabolitos potencialmente beneficiosos para la salud ²⁸¹. Es bien sabido que las semillas de uva, la piel y el orujo tienen un contenido en polifenoles mayor que el mosto, por lo que el tratamiento enzimático con exo-1,3-β-glucanasa y pectinasas durante la obtención del mosto podría servir para incrementar la extracción de polifenoles del orujo de uva^{200, 302}. Además, un aspecto importante a considerar, es la biodisponibilidad de los polifenoles de los alimentos ya que la cantidad de polifenoles en las fuentes dietéticas comunes es mucho menor que las concentraciones incluidas en los estudios realizados *in vitro* e *in vivo* (al menos 10 veces más). También hay que tener en cuenta que la biodisponibilidad y farmacocinética de estos compuestos dependen de las dosis ingeridas, la matriz alimentaria y la microbiota intestinal^{105, 303, 304}. Un estudio reciente en humanos, mostró que el consumo uva tinta, rica en compuestos fenólicos, produjo un aumento en dichos metabolitos en plasma. No obstante, la alta variabilidad interindividual en la absorción y excreción de derivados fenólicos observados es un punto clave a considerar³⁰³. Se han realizado estudios con derivados polifenólicos modificados con lípidos que producen mejor absorción celular, mayor capacidad antioxidante y un efecto antiproliferativo en las células tumorales cultivadas *in vitro*³⁰⁵. También se han investigado nuevos procedimientos para proteger los polifenoles de la degradación digestiva para que puedan alcanzar sus objetivos

terapéuticos a través de los alimentos³⁰⁵. Además, se ha propuesto que la ingesta en la dieta de polifenoles derivados del mosto de uva tiene un efecto beneficioso sobre la microbiota, que a su vez puede mejorar su biodisponibilidad y, por lo tanto, contribuir a mejorar los beneficios para la salud humana¹³².

Los resultados de este meta-análisis unidos a los resultados experimentales del contenido en polifenoles en el mosto de la variedad de Airén, hacen del mosto Airén un posible candidato a ser utilizado en ensayos frente a la leucemia, especialmente por la elevada concentración de quercetina y catequina en el mosto concentrado normal (MCN). Los estudios analizados en el meta-análisis también muestran que la quercetina ha sido utilizada para tratar la leucemia con un efecto positivo, similar a otros estudios frente a la leucemia^{181, 306}. En cuanto a la catequina, un polifenol común en los extractos de la uva³⁰⁷⁻³⁰⁹, también se ha estudiado frente a la leucemia promeolítica¹⁷⁰, y como molécula quimiopreventiva frente al cáncer de próstata³¹⁰.

6. Conclusiones.

Con los resultados obtenidos en la investigación desarrollada en la presente tesis doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. El contenido de polifenoles totales del mosto de la variedad Airén es superior al de los mostos Sauvignon blanc y Verdejo (7,5% y 23% respectivamente) e inferior al de los mostos Gewürztraminer (30%) y Tempranillo (42%).
2. La capacidad antioxidante del mosto de uva y sus extractos es proporcional a la concentración de polifenoles totales presentes en las muestras.
3. El base a los polifenoles cuantificados, los mostos Airén y Gewürztraminer muestran un perfil similar y más rico en polifenoles que los mostos de las variedades Sauvignon Blanc, Verdejo y Tempranillo.
4. Los mostos Airén y Gewürztraminer tienen un elevado contenido en quercetina (5,8 mg/L) y catequina (6,3 mg/L), que supone aproximadamente un 54% más que el detectado en los mostos Sauvignon blanc, Verdejo y Tempranillo.
5. El proceso de concentración del mosto afecta negativamente a los polifenoles, reduciendo su concentración un 70% en el mosto concentrado decolorado (MCD) y un 54% en el mosto concentrado normal (MCN).
6. La revisión sistemática y el meta-análisis realizado indica que los polifenoles de uva inhiben la proliferación de células de leucemia humanas cultivadas *in vitro*, especialmente en líneas celulares derivadas de monocitos (85%) y células mieloides tempranas (64%).
7. El resveratrol (50 μ M) es el polifenol que muestra el mayor efecto inhibitorio de la proliferación de las células de leucemia, 67% (95%IC: 75, 56%).
8. La inhibición del crecimiento de las células de leucemia por efecto de los polifenoles, no es un efecto directo en el arresto del ciclo celular.

6.1. Prospectiva.

A lo largo del trabajo de investigación, se han abierto nuevas vías de investigación, que pueden ser exploradas en un futuro:

1. Ampliar el número de polifenoles analizados en las muestras de mosto.
2. Realizar estudios con mosto de uva y extractos de polifenoles de mosto en líneas celulares de leucemia u otros tipos de cáncer.
3. Estudiar la biodisponibilidad de los polifenoles presentes en mosto, tanto en cultivos celulares, como en organismos superiores y su microbiota intestinal.
4. Industrialmente, explorar la posibilidad de obtener mosto concentrado incluyendo otros varietales distintos de Airén.



7. Referencias bibliográficas

1. Hidalgo Togores J. *Tratado de Enología I*. Ediciones Mundi-Prensa ed. vol 1. 2011; 2011:752.
2. Cabello Sáenz de Santamaría F, Ortiz Marcide JM, Muñoz Organero G, et al. *Variedades de Vid en España*. vol 1. **Editorial Agrícola Española** 2012:504.
3. Columela F. Taxonomía y origen de la vid. *Vinificantum*2011.
4. Hidalgo Togores J. *Tratado de Enología II*. Ediciones Mundi-Prensa ed. vol 2. 2011; 2011.
5. Johnson H. *Historia del vino*. vol 1. 2005:256.
6. Reynier A. *Manual de Viticultura*. vol 1. AMV ediciones; 2013:624.
7. Vin Oid. Informe anual. 2017.
8. Fernandez J. *Tomo 1. Comunidades Autónomas. Sinopsis*. vol 1. Ministerio de Medioambiente y medio rural y marino; 2011.
9. MAGRAMA. Variedades de vid. Web monográfica sobre la vid, la uva y el vino en España. 2020.
10. FAOStat. Informe anual. 2016.
11. ambiente MAyM. Informe Anual del MAGRAMA. 2019. 2019.
12. Wiesenthal M. *Gran Diccionario del Vino*. Edhasa; 2011.
13. Castilla-La Mancha C, UCLM. Plan Estratégico del Sector Vitivinícola Regional elaborado por la Universidad de Castilla-La Mancha para la Consejería de agricultura. 2019. p. 1-119.
14. G AdH. *Obra de agricultura copilada de diversos auctores.de mandado del muy illustre y reuerendissimo Señor el cardenal de España Arcobispo de Toledo. Con preuilegio real*. 1513.
15. Maul E, Röckel F, Ganesch A. Vitis International Variety Catalogue VIVC. <https://www.julius-kuehn.de/>
16. IMDRA. Variedades de uva en España. Instituto de Medioambiente y Agricultura. 2000.
17. Capanoglu E, de Vos RC, Hall RD, Boyacioglu D, Beekwilder J. Changes in polyphenol content during production of grape juice concentrate. *Food Chem*. Aug 15 2013;139(1-4):521-6. doi:10.1016/j.foodchem.2013.01.023
18. Ibáñez J, Muñoz-Organero G, Zinelabidine LH, de Andrés MT, Cabello F, Martínez-Zapater JM. Genetic Origin of the Grapevine Cultivar Tempranillo. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2012;63(4):549-553. doi:10.5344/ajev.2012.12012
19. Presidencia G. Decreto 2484/1967 por el que se aprueba el texto del código alimentario español. 1967. p. 14180-14187.
20. Patricia Carreño O, Torija E, Zapata MA. Contribución al conocimiento del mosto o zumos de uva comerciales. *OFFARM*. 2001;20(5):1-7.
21. Taiz L, Zeiger E. *Plant Physiology*. Fifth Edition ed. Sinauer Associates; 2010.
22. Giovinazzo G, Grieco F. Functional Properties of Grape and Wine Polyphenols. *F Plant Foods Hum Nutr*. 2015;70:454–462. doi:10.1007/s11130-015-0518-1
23. Yravedra Llopis G. El fraude de la chaptalización en vinos de la unión europea. EDITOR ANTONIO MADRID VICENTE ed2014. p. 222.
24. Giovinazzo G, Carluccio MA, Grieco F. Wine Polyphenols and Health. In: *Molecules B*, ed. *Bioactive Molecules*. 2018:1-21.
25. Martin D. Los compuestos fenólicos: un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. . *Rev Inv Agra y Amb*. 2018;9(1):1-24. doi:10.22490/21456453.1968
26. Ávalos García A, Pérez-Urria Carril E. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. 2009. p. 119-145.
27. Flamini R. *Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: polyphenols*. vol 22. *Mass Spectrometry Reviews*,; 2003:218– 250.

28. Flamini R, Mattivi F, De Rosso M, Arapitsas P, Bavaresco L. Advanced Knowledge of Three Important Classes of Grape Phenolics: Anthocyanins, Stilbenes and Flavonols. *International Journal of Molecular Sciences*. 09/27 07/17/received 09/11/revised 09/12/accepted 2013;14(10):19651-19669. doi:10.3390/ijms141019651
29. Callaghan CM, Leggett RE, Levin RM. A Comparison of the Antioxidants and Carbohydrates in Common Wines and Grape Juices. *Free Radicals & Antioxidants*. 01//Jan-Jun2017 2017;7(1):86.
30. Eghbaliferiz S, Iranshahi M. Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals. *Phytotherapy Research*. 09// 2016;30(9):1379.
31. Ignat I, Volf I, Popa VI. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 6/15/ 2011;126(4):1821-1835. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>
32. Lursmanashvili L, Gulua L, Turmanidze T, Enukidze M, Machavariani M, Sanikidze T. Biological Activity of Green Tea Extracts. *БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ЗЕЛЕНОГО ЧАЯ*. 02// 2017;263(2):88.
33. Sapozhnikova Y. Development of liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for analysis of polyphenolic compounds in liquid samples of grape juice, green tea and coffee. *Food Chem*. May 1 2014;150:87-93. doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.131
34. Dimcheva V, Karsheva M. Antioxidant Activity and Polyphenolic Content of the Bulgarian wild herb *Citrus incuanus* L. stored under different conditions. *Journal of Chemical Technology & Metallurgy*. 09// 2017;52(5):781-790.
35. Sakulnarmrat K, Fenech M, Thomas P, Konczak I. Cytoprotective and pro-apoptotic activities of native Australian herbs polyphenolic-rich extracts. *Food Chem*. Jan 1 2013;136(1):9-17. doi:10.1016/j.foodchem.2012.07.089
36. De La Luz Cádiz-Gurrea M, Borrás-Linares I, Lozano-Sánchez J, Joven J, Fernández-Arroyo S, Segura-Carretero A. Cocoa and Grape Seed Byproducts as a Source of Antioxidant and Anti-Inflammatory Proanthocyanidins. *International Journal of Molecular Sciences*. 02// 2017;18(2):1.
37. Romanczyk JLJ, Hammerstone JJF, Buck MM, inventors; Cocoa extracts as antioxidants. 2010.
38. Averilla JN, Oh J, Kim HJ, Kim JS. Potential health benefits of phenolic compounds in grape processing by-products. *Food Sci Biotechnol*. Dec 2019;28(6):1607-1615. doi:10.1007/s10068-019-00628-2
39. Sobhani M, Farzaei MH, Kiani S, Khodarahmi R. Immunomodulatory: Anti-inflammatory/antioxidant Effects of Polyphenols: A Comparative Review on the Parental Compounds and Their Metabolites. *Food Reviews International*. 2020:1-53. doi:10.1080/87559129.2020.1717523
40. Rothwell JA, Urpi-Sarda M, Boto-Ordonez M, et al. Systematic analysis of the polyphenol metabolome using the Phenol-Explorer database. *Mol Nutr Food Res*. Jan 2016;60(1):203-211. doi:10.1002/mnfr.201500435
41. Rothwell JA, Perez-Jimenez J, Neveu V, et al. Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database (Oxford)*. 2013;2013:1-8. doi:10.1093/database/bat070
42. Perez-Jimenez J, Neveu V, Vos F, Scalbert A. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *Eur J Clin Nutr*. Nov 2010;64 Suppl 3:112-120. doi:10.1038/ejcn.2010.221
43. Perez-Jimenez J, Neveu V, Vos F, Scalbert A. Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: an application of the phenol-explorer database. *J Agric Food Chem*. Apr 28 2010;58(8):4959-4969. doi:10.1021/jf100128b

44. Neveu V, Perez-Jimenez J, Vos F, et al. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database (Oxford)*. 2010;2010:1-9. doi:10.1093/database/bap024
45. Rothwell JA, Perez-Jimenez J, Neveu V, et al. Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database*. 2013;2013:bat070-bat070. doi:10.1093/database/bat070
46. Neveu V, Perez-Jimenez J, Vos F, et al. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database (Oxford)*. 2010;2010:bap024. doi:10.1093/database/bap024
47. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp* 2012;27(1):76-89. doi:10.3305/nh.2012.27.1.5418
48. Pietta P, Minoggio M, Bramati L. Plant polyphenols: Structure, occurrence and bioactivity. Article. *Studies in Natural Products Chemistry*. 1/1/2003 2003;28(Part I):257-312. doi:10.1016/S1572-5995(03)80143-6
49. Zhu M, Huang Y, Wang Y, et al. Comparison of (poly)phenolic compounds and antioxidant properties of pomace extracts from kiwi and grape juice. *Food Chem*. Jan 15 2019;271:425-432. doi:10.1016/j.foodchem.2018.07.151
50. El Gharras H. Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. *International Journal of Food Science & Technology*. 2009;44(12):2512-2518. doi:10.1111/j.1365-2621.2009.02077.x
51. Lule SU, Wenshui X. Food Phenolics, Pros and Cons: A Review. *Food Reviews International*. 10// 2005;21(4):367.
52. Derong L, Mengshi X, Jingjing Z, et al. An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. *Molecules*. 10// 2016;21(10):1374.
53. Anantharaju PG, Gowda PC, Vimalambike MG, Madhunapantula SV. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutrition Journal*. 12//12/1/2016 2016;15:1.
54. Zhang A, Wan L Fau - Wu C, Wu C Fau - Fang Y, et al. Simultaneous determination of 14 phenolic compounds in grape canes by HPLC-DAD-UV using wavelength switching detection. *Molecules*. 20131122 DCOM- 20140606 2013;18(11):14241-14257. doi:10.3390/molecules181114241
55. Pérez-Navarro J, Izquierdo-Cañas PM, Mena-Morales A, et al. Phenolic compounds profile of different berry parts from novel *Vitis vinifera* L. red grape genotypes and Tempranillo using HPLC-DAD-ESI-MS/MS: A varietal differentiation tool. *Food Chem*. Oct 15 2019;295:350-360. doi:10.1016/j.foodchem.2019.05.137
56. Amigo-Benavent M, Wang S, Mateos R, Sarriá B, Bravo L. Antiproliferative and cytotoxic effects of green coffee and yerba mate extracts, their main hydroxycinnamic acids, methylxanthine and metabolites in different human cell lines. Article. *Food and Chemical Toxicology*. 8/1/August 2017 2017;106(Part A):125-138. doi:10.1016/j.fct.2017.05.019
57. Galiniak S, Aebischer D, Bartusik-Aebischer D. Health benefits of resveratrol administration. *Acta Biochim Pol*. Feb 28 2019;66(1):13-21. doi:10.18388/abp.2018_2749
58. Romero-Perez AI, Ibern-Gomez M Fau - Lamuela-Raventos RM, Lamuela-Raventos Rm Fau - de La Torre-Boronat MC, de La Torre-Boronat MC. Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices. *J Agric Food Chem*. 20000822 DCOM- 20000822 1999;47:1533-1536. doi:10.1021/jf981024g
59. Dyck GJB, Raj P, Zieroth S, Dyck JRB, Ezekowitz JA. The Effects of Resveratrol in Patients with Cardiovascular Disease and Heart Failure: A Narrative Review. *Int J Mol Sci*. Feb 19 2019;20(4):904-932. doi:10.3390/ijms20040904

60. Ma Z, Zhang X, Xu L, et al. Pterostilbene: Mechanisms of its action as oncostatic agent in cell models and in vivo studies. *Pharmacological Research*. 2019/07/01/ 2019;145(104265):1-12. doi:10.1016/j.phrs.2019.104265
61. Rauf A, Imran M, Butt MS, Nadeem M, Peters DG, Mubarak MS. Resveratrol as an anti-cancer agent: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. Jun 13 2018;58(9):1428-1447. doi:10.1080/10408398.2016.1263597
62. Kiselev KV, Aleynova OA, Grigorochuk VP, Dubrovina AS. Stilbene accumulation and expression of stilbene biosynthesis pathway genes in wild grapevine *Vitis amurensis* Rupr. *Planta*. 2017;245(1):151-159. doi:10.1007/s00425-016-2598-z
63. Durazzo A, Lucarini M, Camilli E, et al. Dietary Lignans: Definition, Description and Research Trends in Databases Development. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2018;23(12):3251. doi:10.3390/molecules23123251
64. Grosso G, Godos J, Lamuela-Raventos R, et al. A comprehensive meta-analysis on dietary flavonoid and lignan intake and cancer risk: Level of evidence and limitations. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2017;61(4):1-20. 1600930. doi:10.1002/mnfr.201600930
65. Khalid M, Saeed ur R, Bilal M, Huang D-f. Role of flavonoids in plant interactions with the environment and against human pathogens — A review. *Journal of Integrative Agriculture*. 2019/01/01/ 2019;18(1):211-230. doi:[https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62555-4](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62555-4)
66. Martinez-Florez S, Gonzalez-Gallego J Fau - Culebras JM, Culebras Jm Fau - Tunon MJ, Tunon MJ. Flavonoids: properties and anti-oxidizing action. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*. 20030107 DCOM- 20030207 2002;XVII(6):271-278.
67. Brodowska KM. Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues. *European Journal of Biological Research*. 04// 2017;7(2):108.
68. Del-Castillo-Alonso MA, Monforte L, Tomas-Las-Heras R, Martinez-Abaigar J, Nunez-Olivera E. Phenolic characteristics acquired by berry skins of *Vitis vinifera* cv. Tempranillo in response to close-to-ambient solar ultraviolet radiation are mostly reflected in the resulting wines. *J Sci Food Agric*. Jan 15 2020;100(1):401-409. doi:10.1002/jsfa.10068
69. Kashyap D, Sharma A, Tuli HS, Sak K, Punia S, Mukherjee TK. Kaempferol – A dietary anticancer molecule with multiple mechanisms of action: Recent trends and advancements. Review Article. *Journal of Functional Foods*. 3/1/March 2017 2017;30:203-219. doi:10.1016/j.jff.2017.01.022
70. Lerman JS, Haslem J, Kim L, et al. Collected Research on Phytonutrients: Flavonoids. *Journal of Culinary Science & Technology*. 07// 2015;13(3):214.
71. Chandel M, Kumar M, Sharma U, Kumar N, Singh B, Kaur S. Original Article: Isolation and characterization of flavanols from *Anthocephalus cadamba* and evaluation of their antioxidant, antigenotoxic, cytotoxic and COX-2 inhibitory activities. Article. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 7/1/July-August 2016 2016;26:474-483. doi:10.1016/j.bjfp.2016.02.007
72. Lewandowska U, Szewczyk K, Owczarek K, et al. Flavanols from Japanese quince (*Chaenomeles japonica*) fruit inhibit human prostate and breast cancer cell line invasiveness and cause favorable changes in Bax/Bcl-2 mRNA ratio. *Nutrition And Cancer*. 2013;65(2):273-285. doi:10.1080/01635581.2013.749292
73. Robert H, John P, Qin Z, Buxiang S, Hajime F. Flavanols: digestion, absorption and bioactivity. *Phytochemistry Reviews*. 01/07/ 2008;7(1):195.
74. Teixeira N, Mateus N, de Freitas V. Review: Updating the research on prodelphinidins from dietary sources. Review Article. *Food Research International*. 7/1/July 2016 2016;85:170-181. doi:10.1016/j.foodres.2016.04.026
75. Gupta M, Dey S, Marbaniang D, Pal P, Ray S, Mazumder B. Grape seed extract: having a potential health benefits. *J Food Sci Technol*. 2020/04/01 2020;57(4):1205-1215. doi:10.1007/s13197-019-04113-w
76. Odai T, Terauchi M, Kato K, Hirose A, Miyasaka N. Effects of Grape Seed Proanthocyanidin Extract on Vascular Endothelial Function in Participants with

- Prehypertension: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Nutrients*. Nov 20 2019;11(12)doi:10.3390/nu11122844
77. Praud D, Parpinel M, Guercio V, et al. Proanthocyanidins and the risk of prostate cancer in Italy. *Cancer Causes & Control*. 01/19 2018;29:261-268. doi:10.1007/s10552-018-1002-7
78. Tang ST, Khoo HE, Azlan A, Lim SM. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*. 2017;61(1):N.PAG-N.PAG.
79. Goto T, Kondo T. Structure and Molecular Stacking of Anthocyanins—Flower Color Variation. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1991;30(1):17-33. doi:10.1002/anie.199100171
80. Imran M, Aslam T, Atif M, et al. Apigenin as an anticancer agent. *Phytotherapy Research*. 02/14 2020;1:1-17. doi:10.1002/ptr.6647
81. Salehi B, Venditti A, Sharifi-Rad M, et al. The Therapeutic Potential of Apigenin. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(6):1305-1331. doi:10.3390/ijms20061305
82. Quiney C, Dauzonne D, Kern C, et al. Flavones and polyphenols inhibit the NO pathway during apoptosis of leukemia B-cells. *Leukemia Research*. 2004/08/01/ 2004;28(8):851-861. doi:<https://doi.org/10.1016/j.leukres.2003.12.003>
83. de la Parra C, Castillo-Pichardo L, Cruz-Collazo A, et al. Soy Isoflavone Genistein-Mediated Downregulation of miR-155 Contributes to the Anticancer Effects of Genistein. *Nutrition And Cancer*. 2016;68(1):154-164. doi:10.1080/01635581.2016.1115104
84. Hwang K-A, Choi K-C. Anticarcinogenic Effects of Dietary Phytoestrogens and Their Chemopreventive Mechanisms. *Nutrition & Cancer*. 2015;67(5):796-803. doi:10.1080/01635581.2015.1040516
85. Ye L, Chan MY, Leung LK. The soy isoflavone genistein induces estrogen synthesis in an extragonadal pathway. Article. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1/1/2009 2009;302:73-80. doi:10.1016/j.mce.2009.01.003
86. Stopper H, Schmitt E, Kobras K. Review: Genotoxicity of phytoestrogens. Review Article. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1/1/2005 2005;574:139-155. doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.01.029
87. Mir IA, Tiku AB. Chemopreventive and Therapeutic Potential of “Naringenin,” a Flavanone Present in Citrus Fruits. *Nutrition & Cancer*. 2015;67(1):27-42. doi:10.1080/01635581.2015.976320
88. Nibbs A, Scheidt K. Asymmetric Methods for the synthesis of flavanone, chromanones and azaflavanones. *Euro J Org Chem*. 2012;3:449-462. doi:10.1002/ejoc.201101228
89. Kean RJ, Lampion DJ, Dodd GF, et al. Chronic consumption of flavanone-rich orange juice is associated with cognitive benefits: an 8-wk, randomized, double-blind, placebo-controlled trial in healthy older adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2015;101(3):506-514. doi:10.3945/ajcn.114.088518
90. Luqman S, Meena A, Singh P, et al. Neoflavonoids and tetrahydroquinolones as possible cancer chemopreventive agents. *Chemical biology & drug design*. 2012;80(4):616-624. doi:10.1111/j.1747-0285.2012.01439.x
91. M. X. Donnelly D, Sheridan H. Neoflavonoids. 1988:211-232.
92. Hassan YI, Kosir V, Yin X, Ross K, Diarra MS. Grape Pomace as a Promising Antimicrobial Alternative in Feed: A Critical Review. *J Agric Food Chem*. Sep 4 2019;67(35):9705-9718. doi:10.1021/acs.jafc.9b02861
93. Martínez-Lüscher J, Sánchez-Díaz M, Delrot S, Aguirreolea J, Pascual I, Gomès E. Ultraviolet-B Radiation and Water Deficit Interact to Alter Flavonol and Anthocyanin Profiles in Grapevine Berries through Transcriptomic Regulation. *Plant & Cell Physiology*. 11// 2014;55(11):1925.
94. Saiko P, Szakmary A, Jaeger W, Szekeres T. Review: Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad?

- Review Article. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*. 1/1/2008 2008;658:68-94. doi:10.1016/j.mrrev.2007.08.004
95. Han X, Shen T, Lou H. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Sciences*. 2007;8(9):950-988. doi:PMC3871896
96. Crupi P, Coletta A Fau - Anna Milella R, Anna Milella R Fau - Perniola R, et al. HPLC-DAD-ESI-MS analysis of flavonoid compounds in 5 seedless table grapes grown in Apulian Region. *JFood Sci*. 20120220 DCOM- 20120618 2012;77(2):174-181. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02555.x
97. Pérez-Navarro J, Cazals G, Enjalbal C, Izquierdo-Cañas PM, Gómez-Alonso S, Saucier C. Flavanol Glycoside Content of Grape Seeds and Skins of *Vitis vinifera* Varieties Grown in Castilla-La Mancha, Spain. *Molecules*. Nov 5 2019;24(21)doi:10.3390/molecules24214001
98. Savalekar K, Ahammed Shabeer TP, Khan Z, et al. Targeted phenolic profiling of Sauvignon blanc and Shiraz grapes grown in two regions of India by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of food science and technology*. 2019;56(7):3300-3312. doi:10.1007/s13197-019-03802-w
99. Serratosa MP, Marquez A, Moyano L, Zea L, Merida J. Chemical and morphological characterization of Chardonnay and Gewürztraminer grapes and changes during chamber-drying under controlled conditions. *Food Chem*. Sep 15 2014;159:128-36. doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.167
100. Arribas AS, Martinez-Fernandez M Fau - Moreno M, Moreno M Fau - Bermejo E, Bermejo E Fau - Zapardiel A, Zapardiel A Fau - Chicharro M, Chicharro M. Classification of Spanish white wines using their electrophoretic profiles obtained by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. 20140606 DCOM- 20150112 2014;(1522-2683 (Electronic))
101. Ivanova NN, Khomich LM, Perova IB, Eller KI. Grape juice nutritional profile. *Vopr Pitan*. 2018;87(6):95-105. doi:10.24411/0042-8833-2018-10046
102. Garrido J, Borges F. Wine and grape polyphenols — A chemical perspective. *Food Research International*. 12// 2013;54(2):1844-1858. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.002>
103. Scapagnini G, Davinelli S. Nutraceuticals for skin health: an update on polyphenols. *European Journal of Aesthetic Medicine & Dermatology*. 01/02/2017 Supplement 2017;7:23.
104. Lorrain B, Ky I Fau - Pechamat L, Pechamat L Fau - Teissedre P-L, Teissedre PL. Evolution of analysis of polyphenols from grapes, wines, and extracts. *Molecules*. 20130117 DCOM- 20130617 2013;18(1):1076-1100. doi:10.3390/molecules18011076.
105. Lingua MS, Theumer MG, Kruzynski P, Wunderlin DA, Baroni MV. Bioaccessibility of polyphenols and antioxidant properties of the white grape by simulated digestion and Caco-2 cell assays: Comparative study with its winemaking product. *Food Research International*. 2019/08/01/ 2019;122:496-505. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.05.022>
106. Olmo-Cunillera A, Escobar-Avello D, Perez AJ, Marhuenda-Munoz M, Lamuela-Raventos RM, Vallverdu-Queralt A. Is Eating Raisins Healthy? *Nutrients*. Dec 24 2019;12(1):54-71. doi:10.3390/nu12010054
107. Ferreira Reis J, Monteiro VVS, de Souza Gomes R, et al. Action mechanism and cardiovascular effect of anthocyanins: a systematic review of animal and human studies. *Journal of Translational Medicine*. 11/15/ 2016;14:1.
108. Estrela JM, Ortega A, Mena S, Rodriguez ML, Asensi M. Pterostilbene: Biomedical applications. *Critical Reviews In Clinical Laboratory Sciences*. 2013;50(3):65-78. doi:10.3109/10408363.2013.805182
109. Godos J, Vitale M, Micek A, et al. Dietary Polyphenol Intake, Blood Pressure, and Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Antioxidants*. 2019;8(6):152-173. doi:10.3390/antiox8060152

110. Li S-H, Zhao P, Tian H-B, Chen L-H, Cui L-Q. Effect of Grape Polyphenols on Blood Pressure: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PloS one*. 2015;10(9):1-12. e0137665-e0137665. doi:10.1371/journal.pone.0137665
111. Cheng Y-C, Sheen J-M, Hu WL, Hung Y-C. Polyphenols and Oxidative Stress in Atherosclerosis-Related Ischemic Heart Disease and Stroke. *Oxidative Medicine & Cellular Longevity*. 2017;16. 8526438.
112. Cho S, Namkoong K, Shin M, et al. Cardiovascular Protective Effects and Clinical Applications of Resveratrol. *Journal of Medicinal Food*. 04// 2017;20(4):323.
113. Guo J, Cheng J, North BJ, Wei W. Review: Functional analyses of major cancer-related signaling pathways in Alzheimer's disease etiology. Review Article. *BBA - Reviews on Cancer*. 12/1/December 2017 2017;1868:341-358. doi:10.1016/j.bbcan.2017.07.001
114. Zhao D, Simon JE, Wu Q. A critical review on grape polyphenols for neuroprotection: Strategies to enhance bioefficacy. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2020;60(4):597-625. doi:10.1080/10408398.2018.1546668
115. Reddy PH, Manczak M, Xiangling Y, et al. Protective Effects of Indian Spice Curcumin Against Amyloid- β in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 01/22/ 2018;61(3):843.
116. Marcelli S, Ficulle E, Piccolo L, Corbo M, Feligioni M. An overview of the possible therapeutic role of SUMOylation in the treatment of Alzheimer's disease. Review Article. *Pharmacological Research*. 12/21 2017;doi:10.1016/j.phrs.2017.12.023
117. Gol M, Ghorbanian D, Soltanpour N, Faraji J, Pourghasem M. Protective effect of raisin (currant) against spatial memory impairment and oxidative stress in Alzheimer disease model. *Nutritional Neuroscience*. 08/16 2017;22:1-9. doi:10.1080/1028415X.2017.1354959
118. Noratqah SB, Naina-Mohamed I, Zulfarina MS, Qodriyah HM. Natural Polyphenols in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr Drug Targets*. Mar 28 2017;doi:10.2174/1389450118666170328122527
119. Omar SH, Scott CJ, Hamlin AS, Obied HK. Reviews: Current Topics: The protective role of plant biophenols in mechanisms of Alzheimer's disease. Review Article. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 9/1/September 2017 2017;47:1-20. doi:10.1016/j.jnutbio.2017.02.016
120. Libro R, Giacoppo S, Soundara Rajan T, Bramanti P, Mazzon E. Natural Phytochemicals in the Treatment and Prevention of Dementia: An Overview. *Molecules*. 04// 2016;21(4):518.
121. Rangarajan P, Karthikeyan A, Dheen S. Role of dietary phenols in mitigating microglia-mediated neuroinflammation. *NeuroMolecular Medicine*. 09// 2016;18(3):453.
122. Gardener SL, Rainey-Smith SR, Martins RN. Diet and Inflammation in Alzheimer's Disease and Related Chronic Diseases: A Review. *Journal of Alzheimer's Disease*. 03/15/ 2016;50(2):301.
123. Pasinetti GM, Wang J, Ho L, Zhao W, Dubner L. Roles of resveratrol and other grape-derived polyphenols in Alzheimer's disease prevention and treatment. *Biochim Biophys Acta*. Jun 2015;1852(6):1202-8. doi:10.1016/j.bbadis.2014.10.006
124. Almeida S, Alves M, Sousa M, Oliveira P, Silva B. Are Polyphenols Strong Dietary Agents Against Neurotoxicity and Neurodegeneration. *Neurotoxicity Research*. 10// 2016;30(3):345-366.
125. Magrone T, Magrone M, Russo MA, Jirillo E. Recent Advances on the Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Red Grape Polyphenols: In Vitro and In Vivo Studies. *Antioxidants*. 2019;9(1):35-63. doi:10.3390/antiox9010035
126. Natarajan SB, Hwang JW, Kim YS, Kim EK, Park PJ. Ocular promoting activity of grape polyphenols-A review. *Environ Toxicol Pharmacol*. Mar 2017;50:83-90. doi:10.1016/j.etap.2016.12.004
127. Wang S, Wang Z, Yang S, et al. Tissue Distribution of trans-Resveratrol and Its Metabolites after Oral Administration in Human Eyes. *Journal of Ophthalmology*. 03/20/ 2017:1.

128. Goutham G, Manikandan R, Beulaja M, et al. A focus on resveratrol and ocular problems, especially cataract: From chemistry to medical uses and clinical relevance. Review Article. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2/1/February 2017 2017;86:232-241. doi:10.1016/j.biopha.2016.11.141
129. Li YR, Li S, Lin CC. Effect of resveratrol and pterostilbene on aging and longevity. *Biofactors*. Dec 6 2017;doi:10.1002/biof.1400
130. Zorraquín I, Sánchez-Hernández E, Ayuda-Durán B, et al. Current and future experimental approaches in the study of grape and wine polyphenols interacting gut microbiota. *J Sci Food Agric*. Mar 13 2020;doi:10.1002/jsfa.10378
131. Gil-Sanchez I, Cueva C, Tamargo A, et al. Application of the dynamic gastrointestinal simulator (simgi(R)) to assess the impact of probiotic supplementation in the metabolism of grape polyphenols. *Food Res Int*. Mar 2020;129:108790. doi:10.1016/j.foodres.2019.108790
132. Nash V, Ranadheera CS, Georgousopoulou EN, et al. The effects of grape and red wine polyphenols on gut microbiota - A systematic review. *Food Res Int*. Nov 2018;113:277-287. doi:10.1016/j.foodres.2018.07.019
133. Chedea VS, Palade LM, Marin DE, et al. Intestinal Absorption and Antioxidant Activity of Grape Pomace Polyphenols. *Nutrients*. May 9 2018;10(5)doi:10.3390/nu10050588
134. Bladé C, Aragonès G, Arola-Arnal A, et al. Proanthocyanidins in health and disease. *Biofactors*. 01//Jan/Feb2016 2016;42(1):5.
135. Chondrogianni N, Kapeta S, Chinou I, Vassilatou K, Papassideri I, Gonos ES. Anti-ageing and rejuvenating effects of quercetin. Article. *Experimental Gerontology*. 1/1/2010 2010;45:763-771. doi:10.1016/j.exger.2010.07.001
136. Santana-Gálvez J, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA. Chlorogenic Acid: Recent Advances on Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome. *Molecules*. 03// 2017;22(3):1.
137. Health Nlo. Cancer Types. 2020.
138. SEOM. Las cifras del cáncer en España. 2020. In: Sociedad EdM, editor. 2020. p. 1-24.
139. Chojnacka K, Lewandowska U. The Antiangiogenic Activity of Polyphenol-Rich Extracts and Its Implication on Cancer Chemoprevention. *Food Reviews International*. 2020/01/02 2020;36(1):77-103. doi:10.1080/87559129.2019.1630634
140. Paller CJ, Zhou XC, Heath EI, et al. Muscadine Grape Skin Extract in Men with Biochemically Recurrent Prostate Cancer: A Randomized, Multicenter, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Clin Cancer Res*. Nov 7 2017;doi:10.1158/1078-0432.ccr-17-1100
141. Mazewski C, Liang K, Gonzalez de Mejia E. Comparison of the effect of chemical composition of anthocyanin-rich plant extracts on colon cancer cell proliferation and their potential mechanism of action using in vitro, in silico, and biochemical assays. Article. *Food Chemistry*. 3/1/1 March 2018 2018;242:378-388. doi:10.1016/j.foodchem.2017.09.086
142. Alamolhodaie NS, Tsatsakis AM, Ramezani M, Hayes AW, Karimi G. Review: Resveratrol as MDR reversion molecule in breast cancer: An overview. Review Article. *Food and Chemical Toxicology*. 5/1/May 2017 2017;103:223-232. doi:10.1016/j.fct.2017.03.024
143. Woo Hyun P. Gallic acid induces HeLa cell death via increasing GSH depletion rather than ROS levels. *Oncology Reports*. 02// 2017;37(2):1277.
144. Hashemzaei M, Far AD, Yari A, et al. Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin in vitro and in vivo. *Oncology Reports*. 08// 2017;38(2):819.
145. Lima KG, Krause GC, Schuster AD, et al. Gallic acid reduces cell growth by induction of apoptosis and reduction of IL-8 in HepG2 cells. Article. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 12/1/December 2016 2016;84:1282-1290. doi:10.1016/j.biopha.2016.10.048
146. Haiqing GUO, Feng REN, Li Z, et al. Kaempferol induces apoptosis in HepG2 cells via activation of the endoplasmic reticulum stress pathway. *Molecular Medicine Reports*. 03// 2016;13(3):2791.
147. Azevedo C, Correia-Branco A, Araújo JR, Guimarães JT, Keating E, Martel F. The Chemopreventive Effect of the Dietary Compound Kaempferol on the MCF-7 Human Breast

- Cancer Cell Line Is Dependent on Inhibition of Glucose Cellular Uptake. *Nutrition & Cancer*. 2015;67(3):504-513. doi:10.1080/01635581.2015.1002625
148. Ho C-C, Huang A-C, Yu C-S, et al. Ellagic acid induces apoptosis in TSGH8301 human bladder cancer cells through the endoplasmic reticulum stress- and mitochondria-dependent signaling pathways. *Environmental Toxicology*. 11// 2014;29(11):1262.
149. Khurana S, Venkataraman K Fau - Hollingsworth A, Hollingsworth A Fau - Piche M, Piche M Fau - Tai TC, Tai TC. Polyphenols: benefits to the cardiovascular system in health and in aging. *Nutrients*. 2013;5(3779-3827)(10)doi:10.3390/nu5103779
150. Olaeta R, Cundín M. *Glosario del cáncer*. Aula Medicina y conocimiento; 2007.
151. Harrison T. *Oncología y hematología*. Principios de Medicina Interna; 2006.
152. Roy M, Mukherjee A, Mukherjee S, Biswas J. Drug Resistance in Leukemia: Remediation by Natural Means. *Biomedical Research Journal*. 04// 2017;4(1):8.
153. Pizzo A, Poplack P, David G. Principles and practice of Pediatric Oncology. Philadelphia (USA). . Lippincott Williams & Wilkins.2002. p. 545.
154. Lenhard R, Osteen R, Gansler T. The American Cancer Society's Clinical Oncology. . The American Cancer Society, Atlanta, Georgia2001.
155. Clarke CJ, Holyoake TL. Preclinical approaches in chronic myeloid leukemia: from cells to systems. *Experimental hematology*. 2017;47:13-23. doi:10.1016/j.exphem.2016.11.005
156. Pui CH, Yang JJ, Bhakta N, Rodriguez-Galindo C. Global efforts toward the cure of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Child Adolesc Health*. Jun 2018;2(6):440-454. doi:10.1016/s2352-4642(18)30066-x
157. Huang X-t, Li X, Xie M-l, et al. Resveratrol: Review on its discovery, anti-leukemia effects and pharmacokinetics. *Chemico-Biological Interactions*. 2019/06/01/ 2019;306:29-38. doi:10.1016/j.cbi.2019.04.001
158. Kouhpeikar H, Butler AE, Bamian F, Barreto GE, Majeed M, Sahebkar A. Curcumin as a therapeutic agent in leukemia. *J Cell Physiol*. Aug 2019;234(8):12404-12414. doi:10.1002/jcp.28072
159. Morceau F, Chateauvieux S, Orsini M, Trécul A, Dicato M, Diederich M. Research review paper: Natural compounds and pharmaceuticals reprogram leukemia cell differentiation pathways. Review Article. *Biotechnology Advances*. 11/1/1 November 2015 2015;33(1):785-797. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.03.013
160. De Martino L, D'Arena G, Filosa R, Peduto A, Zeppa R, De Feo V. Natural compounds in anti-leukaemic therapy: a review. *Mini Rev Med Chem*. Jun 2011;11(6):492-502.
161. Frazzi R, Guardi M. Cellular and Molecular Targets of Resveratrol on Lymphoma and Leukemia Cells. *Molecules*. 06// 2017;22(6):1.
162. Khan OS, Bhat AA, Krishnankutty R, Mohammad RM, Uddin S. Therapeutic Potential of Resveratrol in Lymphoid Malignancies. Article. *Nutrition & Cancer*. 2016;68(3):365-373. doi:10.1080/01635581.2016.1152386
163. Frazzi R, Tigano M. The Multiple Mechanisms of Cell Death Triggered by Resveratrol in Lymphoma and Leukemia. *International Journal of Molecular Sciences*. 03// 2014;15(3):4977.
164. Spagnuolo C, Russo M, Bilotto S, Tedesco I, Laratta B, Russo GL. Dietary polyphenols in cancer prevention: the example of the flavonoid quercetin in leukemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012/07/01 2012;1259(1):95-103. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06599.x
165. Zambonin L, Caliceti C, Vieceli Dalla Sega F, et al. Dietary phenolic acids act as effective antioxidants in membrane models and in cultured cells, exhibiting proapoptotic effects in leukaemia cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:839298. doi:10.1155/2012/839298
166. Brisdelli F, Di Francesco L, Giorgi A, et al. Proteomic Analysis of Quercetin-Treated K562 Cells. *Int J Mol Sci*. Dec 19 2019;21(1)doi:10.3390/ijms21010032
167. Lu X-L, Zhao C-H, Yao X-L, Zhang H. Original article: Quercetin attenuates high fructose feeding-induced atherosclerosis by suppressing inflammation and apoptosis via ROS-regulated

- PI3K/AKT signaling pathway. Article. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 1/1/January 2017 2017;85:658-671. doi:10.1016/j.biopha.2016.11.077
168. Lee T-J, Kim OH, Kim YH, et al. Quercetin arrests G2/M phase and induces caspase-dependent cell death in U937 cells. Article. *Cancer Letters*. 2006;240(2):234-242. doi:10.1016/j.canlet.2005.09.013
169. Tolomeo M, Grimaudo S, Cristina AD, et al. Pterostilbene and 3'-hydroxypterostilbene are effective apoptosis-inducing agents in MDR and BCR-ABL-expressing leukemia cells. Article. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 1/1/2005 2005;37:1709-1726. doi:10.1016/j.biocel.2005.03.004
170. Zhang L, Chen QS, Xu PP, et al. Catechins induced acute promyelocytic leukemia cell apoptosis and triggered PML-RARalpha oncoprotein degradation. *J Hematol Oncol*. Oct 1 2014;7:75. doi:10.1186/s13045-014-0075-3
171. Ferry-Dumazet H, Garnier O, Mamani-Matsuda M, et al. Resveratrol inhibits the growth and induces the apoptosis of both normal and leukemic hematopoietic cells. *Carcinogenesis*. 2002;23(8):1327-1333. doi:10.1093/carcin/23.8.1327
172. Wei-Jie CAO, Ke WU, Chong W, Ding-Ming WAN. Polydatin-induced cell apoptosis and cell cycle arrest are potentiated by Janus kinase 2 inhibition in leukemia cells. *Molecular Medicine Reports*. 04// 2016;13(4):3297.
173. Urbaniak A, Delgado M, Kacprzak K, Chambers TC. Activity of resveratrol triesters against primary acute lymphoblastic leukemia cells. *Bioorg Med Chem Lett*. Jun 15 2017;27(12):2766-2770. doi:10.1016/j.bmcl.2017.04.066
174. Siedlecka-Kroplewska K, Jozwik A, Boguslawski W, et al. Pterostilbene induces accumulation of autophagic vacuoles followed by cell death in HL60 human leukemia cells. *J Physiol Pharmacol*. Oct 2013;64(5):545-556.
175. Huang P-J, Hseu Y-C, Lee M-S, et al. In vitro and in vivo activity of gallic acid and Toona sinensis leaf extracts against HL-60 human premyelocytic leukemia. Article. *Food and Chemical Toxicology*. 10/1/October 2012 2012;50:3489-3497. doi:10.1016/j.fct.2012.06.046
176. Chandramohan Reddy T, Bharat Reddy D, Aparna A, et al. Anti-leukemic effects of gallic acid on human leukemia K562 cells: Downregulation of COX-2, inhibition of BCR/ABL kinase and NF-κB inactivation. Article. *Toxicology in Vitro*. 4/1/April 2012 2012;26:396-405. doi:10.1016/j.tiv.2011.12.018
177. Shanafelt TD, Call TG, Zent CS, et al. Phase 2 trial of daily, oral polyphenon E in patients with asymptomatic, Rai stage 0 to II chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2013;119(2):363-370. doi:10.1002/cncr.27719
178. Saiko P, Steinmann M-T, Schuster H, et al. Epigallocatechin gallate, ellagic acid, and rosmarinic acid perturb dNTP pools and inhibit de novo DNA synthesis and proliferation of human HL-60 promyelocytic leukemia cells: Synergism with arabinofuranosylcytosine. Article. *Phytomedicine*. 1/15/15 January 2015 2015;22:213-222. doi:10.1016/j.phymed.2014.11.017
179. Fantini M, Benvenuto M, Masuelli L, et al. In Vitro and in Vivo Antitumoral Effects of Combinations of Polyphenols, or Polyphenols and Anticancer Drugs: Perspectives on Cancer Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*. 05// 2015;16(5):9236.
180. Mertens-Talcott SU, Bomser JA, Romero C, Talcott ST, Percival SS. Ellagic Acid Potentiates the Effect of Quercetin on p21waf1/cip1, p53, and MAP-Kinases without Affecting Intracellular Generation of Reactive Oxygen Species In Vitro. *Journal of Nutrition*. 03// 2005;135(3):609.
181. Mertens-Talcott SU, Talcott ST, Percival SS. Low Concentrations of Quercetin and Ellagic Acid Synergistically Influence Proliferation, Cytotoxicity and Apoptosis in MOLT-4 Human Leukemia Cells. *The Journal of Nutrition*. 2003;133(8):2669-2674. doi:10.1093/jn/133.8.2669
182. Higgins J, Green S. Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions Version 5.1.0 In: Green S, editor. www.cochrane-handbook.org.: The Cochrane Collaboration; 2011. p. 1-639.

183. Higgins JPT, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG. Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ (Clinical research ed)*. 2003;327(7414):557-560. doi:10.1136/bmj.327.7414.557
184. Moher D, Shamseer L, Clarke M, Clarke M, Ghera D, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Syst Rev*. 2015;4(1):1-9. doi:10.1186/2046-4053-4-1
185. Shamseer L, Moher D, Clarke M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015: elaboration and explanation. *Bmj*. Jan 2 2015;349:1-25. doi:10.1136/bmj.g7647
186. Hutton B, Salanti G, Caldwell D, et al. The PRISMA Extension Statement for Reporting of Systematic Reviews Incorporation Network Meta-analyses of Health Care Interventions: Checklist and Explanation *Annals of Internal Medicine*; 2015.
187. *Review Manager (RevMan) [Computer program]. Version 5.3. Copenhagen: The Nordic Cochrane Centre, The Cochrane Collaboration, 2014. 2014.*
188. Joffe L, Ladas EJ. Nutrition during childhood cancer treatment: current understanding and a path for future research. *Lancet Child Adolesc Health*. Feb 13 2020;doi:10.1016/s2352-4642(19)30407-9
189. Corp I. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp. 2017.
190. *R CT. R: A language and environment for statistical computing. . R, Foundation for Statistical Computing; 2012.*
191. Lu S-C, Liao W-R, Chen S-F. *Quantification of Trans-resveratrol in Red Wines Using QuEChERS Extraction Combined with Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry*. vol 34. 2018:439-444.
192. Biniari K, Xenaki M, Daskalakis I, Rusjan D, Bouza D, Stavrakaki M. Polyphenolic compounds and antioxidants of skin and berry grapes of Greek *Vitis vinifera* cultivars in relation to climate conditions. *Food Chem*. Mar 1 2020;307:125518. doi:10.1016/j.foodchem.2019.125518
193. Xia L, Xu C, Huang K, Lu J, Zhang Y. Evaluation of phenolic compounds, antioxidant and antiproliferative activities of 31 grape cultivars with different genotypes. *J Food Biochem*. Jun 2019;43(6):e12626. doi:10.1111/jfbc.12626
194. Gazzola D, Vincenzi S, Marangon M, Pasini G, Curioni A. Grape seed extract: the first protein-based fining agent endogenous to grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2017;23(2):215-225. doi:10.1111/ajgw.12268
195. Rasines-Perea Z, Ky I, Cros G, Crozier A, Teissedre PL. Grape Pomace: Antioxidant Activity, Potential Effect Against Hypertension and Metabolites Characterization after Intake. *Diseases*. Jul 6 2018;6(3)doi:10.3390/diseases6030060
196. Casazza AA, Aliakbarian B, Sannita E, Perego P. High-pressure high-temperature extraction of phenolic compounds from grape skins. *International Journal of Food Science & Technology*. 2012;47(2):399-405. doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02853.x
197. Guerrero MS, Torres JS, Nuñez MJ. Extraction of polyphenols from white distilled grape pomace: Optimization and modelling. *Bioresource Technology*. 3// 2008;99(5):1311-1318. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.02.009>
198. Hasan M, Bae H. An Overview of Stress-Induced Resveratrol Synthesis in Grapes: Perspectives for Resveratrol-Enriched Grape Products. *Molecules*. Feb 14 2017;22(2)doi:10.3390/molecules22020294
199. De Rosso M, Bavaresco L, De Marchi F, et al. Study of grape bioactive stilbenes by suspect screening metabolomics. *Nutrition & Aging*. 06// 2014;2(2):179.
200. Lima Mdos S, da Conceicao Prudencio Dutra M, Toaldo IM, et al. Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced in industrial scale by different processes of maceration. *Food Chem*. Dec 1 2015;188:384-92. doi:10.1016/j.foodchem.2015.04.014
201. Barba FJ, Zhu Z, Koubaa M, Sant'Ana AS, Orlie V. Review: Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A

- review. Review Article. *Trends in Food Science & Technology*. 3/1/March 2016 2016;49:96-109. doi:10.1016/j.tifs.2016.01.006
202. Ju ZY, Howard LR. Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *J Agric Food Chem*. 2003;51(18):5207-5213. doi:doi.org/10.1021/jf0302106
203. Hashim SN, Schwarz Lj Fau - Boysen RI, Boysen Ri Fau - Yang Y, Yang Y Fau - Danylec B, Danylec B Fau - Hearn MTW, Hearn MT. Rapid solid-phase extraction and analysis of resveratrol and other polyphenols in red wine. 20131004 DCOM- 20140311 2013;(1873-3778 (Electronic))
204. Moure A, Cruz JM, Franco D, et al. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. 2001;72(2):145-171. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00223-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00223-5)
205. Piftis A, Goutzourelas N, Halabalaki M, et al. Effect of polyphenols from coffee and grape on gene expression in myoblasts. *Mech Ageing Dev*. Jun 2018;172:115-122. doi:10.1016/j.mad.2017.11.015
206. Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, et al. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999/10/01 1999;47(10):3954-3962. doi:10.1021/jf990146l
207. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*. 1995/01/01/ 1995;28(1):25-30. doi:[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
208. Guija-Poma E, Inocente-Camones M, Ponce-Pardo J, Zarzosa-Norabuena E. Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-Picrihidrazilo (DPPH) para determinar la capacidad antioxidante. *Horiz Med*. 2015;15(1):57-60.
209. Sánchez JC, García RF, Cors MTM. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical and superoxide anion scavenging activity of *Rhizophora mangle* (L.) bark. *Pharmacognosy Research*. 09// 2010;2(5):279.
210. Colombo RC, Roberto SR, Nixdorf SL, et al. Analysis of the phenolic composition and yield of 'BRS Vitoria' seedless table grape under different bunch densities using HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Food Research International*. 2020/04/01/ 2020;130:108955. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108955>
211. Jaitz L, Siegl K, Eder R, et al. LC-MS/MS analysis of phenols for classification of red wine according to geographic origin, grape variety and vintage. *Food Chemistry*. 9/1/ 2010;122(1):366-372. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.053>
212. Rodríguez-Bernaldo de Quiros MA, Lage Yuste A, López-Hernández J. HPLC-analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay. *Food Research International*. 2009;42(8):1018-1022. doi:10.1016/j.foodres.2009.04.009
213. Escobar-Avello D, Lozano-Castellón J, Mardones C, et al. Phenolic Profile of Grape Canes: Novel Compounds Identified by LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS. *Molecules*. 10/18 2019;24doi:10.3390/molecules24203763
214. Seraglio SKT, Vales AC, Daguer H, et al. Development and validation of a LC-ESI-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in honeydew honeys with the diluted-and-shoot approach. *Food Research International*. 2016/09/01/ 2016;87:60-67. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.019>
215. Yang C, Wang Z, Mi Y, et al. UHPLC-MS/MS Determination, Pharmacokinetic, and Bioavailability Study of Taxifolin in Rat Plasma after Oral Administration of its Nanodispersion. *Molecules*. 2016;21:494-505. doi:10.3390/molecules21040494
216. Engström MT, Päljjarvi M, Salminen J-P. Rapid Fingerprint Analysis of Plant Extracts for Ellagitannins, Gallic Acid, and Quinic Acid Derivatives and Quercetin-, Kaempferol- and Myricetin-Based Flavonol Glycosides by UPLC-QqQ-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015/04/29 2015;63(16):4068-4079. doi:10.1021/acs.jafc.5b00595

217. Jiamboonsri P, Pithayanukul P, Bavovada R, Gao S, Hu M. A validated liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of methyl gallate and pentagalloyl glucopyranose: Application to pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography B*. 2015/04/01/ 2015;986-987:12-17.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ichromb.2015.02.006>
218. V DK, Verma PR, Singh SK, Viswanathan S. LC-ESI-MS/MS analysis of quercetin in rat plasma after oral administration of biodegradable nanoparticles. *Biomed Chromatogr*. Nov 2015;29(11):1731-6. doi:10.1002/bmc.3486
219. Lambert M, Meudec E, Verbaere A, et al. A high-throughput UHPLC-QqQ-MS method for polyphenol profiling in rosé wines. *Molecules*. 04/30 2015;20:7890-7914.
doi:10.3390/molecules20057890
220. Liu Q, Liao X, Xu J, Zhao J, Luo J, Kong L. Development and validation of a sensitive and selective LC–MS/MS method for the determination of trans δ -veniferin, a resveratrol dehydromer, in rat plasma and its application to pharmacokinetics and bioavailability studies. *Journal of Chromatography B*. 2014/05/01/ 2014;958:124-129.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ichromb.2014.03.026>
221. Yan L, Yin P, Ma C, Liu Y. Method Development and Validation for Pharmacokinetic and Tissue Distributions of Ellagic Acid Using Ultrahigh Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS). *Molecules*. 2014;19:18923-18935.
doi:10.3390/molecules191118923
222. Zhang Y, Yuan J, Wang Y, An R, Wang X. LC-MS/MS determination and pharmacokinetics study of puerarin and daidzein in rat plasma after oral administration of Gegenqinlian decoction and Radix Puerariae extract. *Pharmacogn Mag*. Jul 2014;10(39):241-8.
doi:10.4103/0973-1296.137363
223. Krieger S, Hayen H, Schmitz OJ. Quantification of coumarin in cinnamon and woodruff beverages using DIP-APCI-MS and LC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013/10/01 2013;405(25):8337-8345. doi:10.1007/s00216-013-7238-x
224. Li Y-y, Song Y-y, Liu C-h, et al. Simultaneous determination of esculin and its metabolite esculetin in rat plasma by LC–ESI-MS/MS and its application in pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*. 2012/10/15/ 2012;907:27-33.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ichromb.2012.08.027>
225. Chng HT, New LS, Neo AH, Goh CW, Browne ER, Chan EC. A sensitive LC/MS/MS bioanalysis assay of orally administered lipoic acid in rat blood and brain tissue. *J Pharm Biomed Anal*. Feb 5 2010;51(3):754-7. doi:10.1016/j.jpba.2009.09.028
226. Gao S, Zhan Q, Fau - Li J, Li J Fau - Yang Q, et al. LC-MS/MS method for the simultaneous determination of ethyl gallate and its major metabolite in rat plasma. *Biomedical chromatography*. 2010;24(5):472-278. doi:10.1002/bmc.1314
227. Shao X, Chen X, Badmaev V, Ho C-T, Sang S. Structural identification of mouse urinary metabolites of pterostilbene using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2010;24(12):1770-1778. doi:10.1002/rcm.4579
228. Shao X, Bai N, He K, Ho C-T, Yang CS, Sang S. Apple Polyphenols, Phloretin and Phloridzin: New Trapping Agents of Reactive Dicarbonyl Species. *Chemical Research in Toxicology*. 2008/10/20 2008;21(10):2042-2050. doi:10.1021/tx800227v
229. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Group P. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS medicine*. 2009;6(7):1-6. e1000097-e1000097. doi:10.1371/journal.pmed.1000097
230. Unidos BNdMdIE. PubMed Library. 1996. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
231. Library C. The Cochrane Library.
<https://www.cochranelibrary.com/es/search?cookiesEnabled>
232. Elsevier. EMBASE library. 1947. <https://www.elsevier.com/solutions/embase-biomedical-research>
233. Unidos BNdMdIE. MedLine database. 1966. <https://medlineplus.gov/spanish/>

234. EBSCO. The CINAHL database. Accessed 1937, 1984.
<https://www.ebscohost.com/nursing/products/cinahl-databases/cinahl-complete>
235. Veritas Health Innovation M. Covidence systematic review software. Veritas Health Innovation, Melbourne, Australia.: Veritas Health Innovation, Melbourne, Australia.; 2019.
236. Socrates A, Pavlov D S, Clavero Ch F. Riesgo relativo y Odds ratio ¿Qué son y cómo se interpretan? *Rev Obstet Ginecol*. 2010;5(1):51-54. doi:10.13140/2.1.4654.6886
237. Edwardes M, Baltzan M. The generalization of the odds ratio, risk ratio and risk difference to r x k tables. *Statist Med*. 2000;19(14):1901-1914. doi:10.1002/1097-0258(20000730)19:14<1901::AID-SIM514>3.0.CO;2-V
238. Reyes-Luengas A, Salinas-Moreno Y, Ovando-Cruz ME, Arteaga-Garibay RI, Martínez-Peña MD. ANÁLISIS DE ÁCIDOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ACUOSOS DE VARIEDADES DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) CON CÁLICES DE COLORES DIVERSOS. (Spanish). *Agro-Ciencia*. 04//abr/may2015 2015;49(3):277.
239. García-Martínez DJ, Calzada Funes J, Martín Saborido C, Santos C. Grape Polyphenols to Arrest in Vitro Proliferation of Human Leukemia Cells: A Systematic Review and Meta-analysis. *Food Reviews International*. 2020:1-18. doi:10.1080/87559129.2020.1810700
240. NIH. MEDLINE Plus. U.S. National Library of Medicine. <https://medlineplus.gov/>
241. Billard C, Izard J-C, Roman V, et al. Comparative Antiproliferative and Apoptotic Effects of Resveratrol, ϵ -viniferin and Vine-shots Derived Polyphenols (Vineatrols) on Chronic B Lymphocytic Leukemia Cells and Normal Human Lymphocytes. *Leukemia & Lymphoma*. 2002/01/01 2002;43(10):1991-2002. doi:10.1080/1042819021000015952
242. Can G, Cakir Z, Kartal Yandım M, Gunduz U, Baran Y. *Apoptotic Effects of Resveratrol, a Grape Polyphenol, on Imatinib-Sensitive and Resistant K562 Chronic Myeloid Leukemia Cells*. vol 32. 2012:2673-8.
243. Chen D, Daniel KG, Chen MS, Kuhn DJ, Landis-Piwowar KR, Dou QP. Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. Article. *Biochemical Pharmacology*. 1/1/2005 2005;69:1421-1432. doi:10.1016/j.bcp.2005.02.022
244. Espino J, Gonzalez-Gomez D, Moreno D, et al. Tempranillo-derived grape seed extract induces apoptotic cell death and cell growth arrest in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. 2013;4:1759-1766. doi:10.1039/c3fo60267b
245. Gao N, Budhraj A, Cheng S, Yao H, Zhang Z, Shi X. Induction of apoptosis in human leukemia cells by grape seed extract occurs via activation of c-Jun NH2-terminal kinase. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(1):140-149. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1447
246. Ghorbani A, Zand H, Jeddi-Tehrani M, Koohdani F, Shidfar F, Keshavarz SA. PTEN over-expression by resveratrol in acute lymphoblastic leukemia cells along with suppression of AKT/PKB and ERK1/2 in genotoxic stress. *Journal of Natural Medicines*. 2015/10/01 2015;69(4):507-512. doi:10.1007/s11418-015-0915-7
247. Gokbulut AA, Apohan E, Baran Y. Resveratrol and quercetin-induced apoptosis of human 232B4 chronic lymphocytic leukemia cells by activation of caspase-3 and cell cycle arrest. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*. 2013;18(3):144-150. doi:10.1179/1607845412Y.0000000042
248. Hu H, Qin Y-m. Grape seed proanthocyanidin extract induced mitochondria-associated apoptosis in human acute myeloid leukaemia 14.3D10 cells. *Chin Med J (Engl)*. 2006;119(5):417-21.
249. Katsuzaki H, Hibasami H, Ohwaki S, et al. *Cyanidin 3-O-beta-D-glucoside isolated from skin of black Glycine max and other anthocyanins isolated from skin of red grape induce apoptosis in human lymphoid leukemia Molt 4B cells*. vol 10. 2003:297-300.
250. Leon-Gonzalez A, José Jara-Palacios M, Abbas M, Heredia FJ, B Schini-Kerth V. Role of epigenetic regulation on the induction of apoptosis in Jurkat leukemia cells by white grape pomace rich in phenolic compounds. *Food Function*. 2017;8:4062 - 4069. doi:10.1039/C7FO00263G

251. Liao H-F, Cheng A-J, Huang H-T, Shen M-L, Hei TK, Chen Y-J. Nuclear factor-kappaB as a switch in regulation of resveratrol-mediated apoptosis and erythrocytic differentiation in human leukaemia cells. *Food Chemistry*. 2012/06/15/ 2012;132(4):2094-2101. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.062>
252. Mertens-Talcott SU, Percival SS, Talcott ST. Extracts from red muscadine and cabernet sauvignon wines induce cell death in MOLT-4 human leukemia cells. *Food Chemistry*. 2008/06/01/ 2008;108(3):824-832. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.037>
253. Sharif T, Auger C, Alhosin M, et al. Red wine polyphenols cause growth inhibition and apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia cells by inducing a redox-sensitive up-regulation of p73 and down-regulation of UHRF1. *European Journal of Cancer*. 2010/03/01/ 2010;46(5):983-994. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2009.12.029>
254. Siedlecka-Kroplewska K, Jozwik A, Kaszubowska L, Kowalczyk A, Boguslawski W. Pterostilbene induces cell cycle arrest and apoptosis in MOLT4 human leukemia cells. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 12// 2012;50(4):574-580.
255. Wang M, Wang L, Pan X-J, Zhang H. Monocytic differentiation of K562 cells induced by proanthocyanidins from grape seeds. journal article. *Archives of Pharmacal Research*. January 01 2012;35(1):129-135. doi:10.1007/s12272-012-0114-y
256. Asou H, Koshizuka K, Kyo T, Takata N, Kamada N, Koeffler HP. Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes, Is a New Inducer of Differentiation in Human Myeloid Leukemias. journal article. *International Journal of Hematology*. June 01 2002;75(5):528-533. doi:10.1007/bf02982118
257. Horvath Z, Saiko P, Illmer C, et al. Synergistic action of resveratrol, an ingredient of wine, with Ara-C and tiazofurin in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Experimental Hematology*. 2005/03/01/ 2005;33(3):329-335. doi:<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2004.11.009>
258. Jen-Liang S, Ming-Tsan L. Resveratrol induces FasL-related apoptosis through Cdc42 activation of ASK1/JNK-dependent signaling pathway in human leukemia HL-60 cells. *Carcinogenesis*. 01// 2005;26(1):1.
259. O'Brien NM, Carpenter R, O'Callaghan YC, O'Grady MN, Kerry JP. Modulatory effects of resveratrol, citroflavan-3-ol, and plant-derived extracts on oxidative stress in U937 cells. *J Med Food*. Summer 2006;9(2):187-95. doi:10.1089/jmf.2006.9.187
260. Sergediene E, Jönsson K, Szymusiak H, Tyrakowska B, Rietjens IMCM, Čenas N. Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells: description of quantitative structure-activity relationships. *FEBS Letters*. 1999/12/03/ 1999;462(3):392-396. doi:[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01561-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01561-6)
261. Leon-Gonzalez A, José Jara-Palacios M, Abbas M, Heredia FJ, B Schini-Kerth V. Role of epigenetic regulation on the induction of apoptosis in Jurkat leukemia cells by white grape pomace rich in phenolic compounds. *Food Function*. 2017;8doi:10.1039/C7FO00263G
262. Espino J, Gonzalez-Gomez D, Moreno D, et al. Tempranillo-derived grape seed extract induces apoptotic cell death and cell growth arrest in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. 2013;doi:10.1039/c3fo60267b
263. Siedlecka-Kroplewska K, Jozwik A, Kaszubowska L, Kowalczyk A, Boguslawski W. Pterostilbene induces cell cycle arrest and apoptosis in MOLT4 human leukemia cells. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 12// 2012;50(4):574.
264. Della Corte A, Chitarrini G, Di Gangi IM, et al. A rapid LC-MS/MS method for quantitative profiling of fatty acids, sterols, glycerolipids, glycerophospholipids and sphingolipids in grapes. *Talanta*. 8/1/ 2015;140:52-61. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.003>
265. Camara MA, Martínez G, Cermeño S, Zafrilla P, Oliva J. Influence of fungicide residues and in vitro gastrointestinal digestion on total antioxidant capacity and phenolic fraction of Graciano and Tempranillo red wines. *J Environ Sci Health B*. 2019;54(12):942-947. doi:10.1080/03601234.2019.1652073

266. Jeong-Hyeon K, Sethi G, Jae-Young U, et al. The Role of Resveratrol in Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 12// 2017;18(12):1.
267. Kim DH, Khan H, Ullah H, et al. MicroRNA targeting by quercetin in cancer treatment and chemoprotection. *Pharmacological Research*. 2019/09/01/ 2019;147:104346. doi:<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104346>
268. Farooqi A, Jabeen S, Attar R, Yaylim I, Xu B. Quercetin-mediated regulation of signal transduction cascades and microRNAs: Natural weapon against cancer: FAROOQI et al. *Journal of Cellular Biochemistry*. 09/06 2018;119doi:10.1002/jcb.27488
269. Calgarotto AK, Maso V, Junior GCF, et al. Antitumor activities of Quercetin and Green Tea in xenografts of human leukemia HL60 cells. *Scientific Reports*. 2018/02/22 2018;8(1):3459. doi:10.1038/s41598-018-21516-5
270. Shi Y, Su X, Cui H, Yu L, Du H, Han Y. Combination of quercetin and Adriamycin effectively suppresses the growth of refractory acute leukemia. *Oncol Lett*. Jul 2019;18(1):153-160. doi:10.3892/ol.2019.10299
271. Hassanzadeh A, Hosseinzadeh E, Rezapour S, Vahedi G, Haghnavaz N, Marofi F. Quercetin Promotes Cell Cycle Arrest and Apoptosis and Attenuates the Proliferation of Human Chronic Myeloid Leukemia Cell Line-K562 Through Interaction with HSPs (70 and 90), MAT2A and FOXM1. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 07/29 2019;19doi:10.2174/1871520619666190729150442
272. Rodrigues Sá R, da Cruz Caldas J, de Andrade Santana D, et al. Multielementar/centesimal composition and determination of bioactive phenolics in dried fruits and capsules containing Goji berries (*Lycium barbarum* L.). *Food Chemistry*. 2019/02/01/ 2019;273:15-23. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.124>
273. Dantas DMM, Oliveira CYB, Costa R, Carneiro-da-Cunha MDG, Gálvez AO, Bezerra RS. Evaluation of antioxidant and antibacterial capacity of green microalgae *Scenedesmus subspicatus*. *Food Sci Technol Int*. Jun 2019;25(4):318-326. doi:10.1177/1082013218825024
274. Altundag EM, Kasaci T, Yilmaz AM, et al. Quercetin-induced cell death in human papillary thyroid cancer (B-CPAP) cells. *Journal of Thyroid Research*. 2016;doi:10.1155/2016/9843675
275. Srivastava S, Somasagara RR, Hegde M, et al. Quercetin, a Natural Flavonoid Interacts with DNA, Arrests Cell Cycle and Causes Tumor Regression by Activating Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Scientific Reports*. 04/15/ 2016:24049.
276. Xiang-An Z, Shuangxi Z, Qing Y, Jing Z. Quercetin induces human colon cancer cells apoptosis by inhibiting the nuclear factor-kappa B Pathway. *Pharmacognosy Magazine*. 04//Apr-Jun2015 2015;11(42):404.
277. Musial C, Kuban-Jankowska A, Gorska-Ponikowska M. Beneficial Properties of Green Tea Catechins. *Int J Mol Sci*. Mar 4 2020;21(5)doi:10.3390/ijms21051744
278. Xu D, Hu MJ, Wang YQ, Cui YL. Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application. *Molecules*. Mar 21 2019;24(6):1123-1138. doi:10.3390/molecules24061123
279. Marunaka Y, Marunaka R, Sun H, et al. Actions of Quercetin, a Polyphenol, on Blood Pressure. *Molecules*. Jan 29 2017;22(2)doi:10.3390/molecules22020209
280. Carullo G, Cappello AR, Frattaruolo L, Badolato M, Armentano B, Aiello F. Quercetin and derivatives: useful tools in inflammation and pain management. *Future Medicinal Chemistry*. 01// 2017;9(1):79.
281. Li P, Liu A, Xiong W, et al. Catechins enhance skeletal muscle performance. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2020;60(3):515-528. doi:10.1080/10408398.2018.1549534
282. Lourenço SC, Moldão-Martins M, Alves VD. Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications. *Molecules*. Nov 15 2019;24(22)doi:10.3390/molecules24224132
283. Fernandes PAR, Le Bourvellec C, Renard C, et al. Revisiting the chemistry of apple pomace polyphenols. *Food Chem*. Oct 1 2019;294:9-18. doi:10.1016/j.foodchem.2019.05.006

284. Dumke CL, Nieman DC, Utter AC, et al. Quercetin's effect on cycling efficiency and substrate utilization. Report. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2009;(6):993.
285. Sun P, Cai R, Chen L, et al. Natural Product Glycosylation: Biocatalytic Synthesis of Quercetin-3,4'-O-diglucoside. *Appl Biochem Biotech*. 2020;(1559-0291)doi:10.1007/s12010-019-03103-0.
286. Palermo M, Pellegrini N, Fogliano V. The effect of cooking on the phytochemical content of vegetables. *J Sci Food Agric*. Apr 2014;94(6):1057-70. doi:10.1002/jsfa.6478
287. Pandey MM, Khatoon S, Rastogi S, Rawat AK. Determination of flavonoids, polyphenols and antioxidant activity of *Tephrosia purpurea*: a seasonal study. *J Integr Med*. Nov 2016;14(6):447-455. doi:10.1016/s2095-4964(16)60276-5
288. Pacifico S, Galasso S, Piccolella S, et al. Seasonal variation in phenolic composition and antioxidant and anti-inflammatory activities of *Calamintha nepeta* (L.) Savi. Article. *Food Research International*. 3/1/March 2015 2015;69:121-132. doi:10.1016/j.foodres.2014.12.019
289. Kumar R, Bhoumik S, Rizvi SI. Redox modulating effects of grape juice during aging. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. Nov 14 2019;doi:10.1515/jbcpp-2019-0144
290. Li YR, Li S, Lin CC. Effect of resveratrol and pterostilbene on aging and longevity. *Biofactors*. Jan 2018;44(1):69-82. doi:10.1002/biof.1400
291. Brglez Mojzer E, Knez Hrnčič M, Škerget M, Knez Ž, Bren U. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*. 2016;21(7):901-939. doi:10.3390/molecules21070901
292. Katsuzaki H, Hibasami H, Ohwaki S, et al. Cyanidin 3-O-beta-D-glucoside isolated from skin of black Glycine max and other anthocyanins isolated from skin of red grape induce apoptosis in human lymphoid leukemia Molt 4B cells. *Oncology Reports*. 2003;10:297-300. doi:10.3892/or.10.2.297
293. Vrhovac Madunic I, Madunic J, Antunovic M, et al. Apigenin, a dietary flavonoid, induces apoptosis, DNA damage, and oxidative stress in human breast cancer MCF-7 and MDA MB-231 cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. May 2018;391(5):537-550. doi:10.1007/s00210-018-1486-4
294. Wen W, Lowe G, Roberts CM, et al. Pterostilbene Suppresses Ovarian Cancer Growth via Induction of Apoptosis and Blockade of Cell Cycle Progression Involving Inhibition of the STAT3 Pathway. *Int J Mol Sci*. Jul 7 2018;19(7):1-12. doi:10.3390/ijms19071983
295. Ravindranathan P, Pasham D, Balaji U, et al. A combination of curcumin and oligomeric proanthocyanidins offer superior anti-tumorigenic properties in colorectal cancer. *Scientific reports*. 2018;8(13869):1-12. doi:10.1038/s41598-018-32267-8
296. Gao Y, Tollefsbol TO. Combinational Proanthocyanidins and Resveratrol Synergistically Inhibit Human Breast Cancer Cells and Impact Epigenetic(-)Mediating Machinery. *Int J Mol Sci*. Jul 27 2018;19(8):2204-2222. doi:10.3390/ijms19082204
297. Lionetti V, Tuana BS, Casieri V, Parikh M, Pierce GN. Importance of functional food compounds in cardioprotection through action on the epigenome. *European Heart Journal*. 2018;40(7):575-582. doi:10.1093/eurheartj/ehy597
298. Tzika E, Dreker T, Imhof A. Epigenetics and Metabolism in Health and Disease. *Frontiers in genetics*. 2018;9:361-369. doi:10.3389/fgene.2018.00361
299. Meng J, Liu GJ, Song JY, et al. Preliminary results indicate resveratrol affects proliferation and apoptosis of leukemia cells by regulating PTEN/PI3K/AKT pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. May 2019;23(10):4285-4292. doi:10.26355/eurrev_201905_17933
300. Siedlecka-Kroplewska K, Wozniak M, Kmiec Z. The wine polyphenol resveratrol modulates autophagy and induces apoptosis in MOLT-4 and HL-60 human leukemia cells. *J Physiol Pharmacol*. Dec 2019;70(6):825-838. doi:10.26402/jpp.2019.6.02
301. Silva LBAR, Pinheiro-Castro N, Novaes GM, Pascoal GdFL, Ong TP. Bioactive food compounds, epigenetics and chronic disease prevention: Focus on early-life interventions with polyphenols. *Food Res Int*. 2019/11/01/ 2019;125(108646):1-14. doi:10.1016/j.foodres.2019.108646

302. Averilla JN, Oh J, Wu Z, et al. Improved extraction of resveratrol and antioxidants from grape peel using heat and enzymatic treatments. *J Sci Food Agric*. Jun 2019;99(8):4043-4053. doi:10.1002/jsfa.9632
303. Castello F, Costabile G, Bresciani L, et al. Bioavailability and pharmacokinetic profile of grape pomace phenolic compounds in humans. *Arch Biochem Biophys*. May 15 2018;646:1-9. doi:10.1016/j.abb.2018.03.021
304. Calvo-Castro LA, Schiborr C, David F, et al. The Oral Bioavailability of Trans-Resveratrol from a Grapevine-Shoot Extract in Healthy Humans is Significantly Increased by Micellar Solubilization. *Mol Nutr Food Res*. May 2018;62(9):1-23. doi:10.1002/mnfr.201701057
305. Xu W, Yang Y, Xue JS, et al. Effect of In Vitro Digestion on Water-in-Oil-in-Water Emulsions Containing Anthocyanins from Grape Skin Powder. *Molecules*. 2018;23(11):1-13. doi:10.3390/molecules23112808
306. Gokbulut AA, Apohan E, Baran Y. Resveratrol and quercetin-induced apoptosis of human 232B4 chronic lymphocytic leukemia cells by activation of caspase-3 and cell cycle arrest. *Hematology* 2013;18(3):144-150. doi:10.1179/1607845412Y.0000000042
307. Ferreyra SG, Antonioli A, Bottini R, Fontana A. Bioactive compounds and total antioxidant capacity of cane residues from different grape varieties. *J Sci Food Agric*. Jan 15 2020;100(1):376-383. doi:10.1002/jsfa.10065
308. Maia M, Ferreira AEN, Laureano G, et al. Vitis vinifera 'Pinot noir' leaves as a source of bioactive nutraceutical compounds. 10.1039/C8FO02328J. *Food & Function*. 2019;10(7):3822-3827. doi:10.1039/C8FO02328J
309. Li F-x, Li F-h, Yang Y-x, Yin R, Ming J. Comparison of phenolic profiles and antioxidant activities in skins and pulps of eleven grape cultivars (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Integrative Agriculture*. 2019/05/01/ 2019;18(5):1148-1158. doi:10.1016/S2095-3119(18)62138-0
310. Perletti G, Magri V, Vral A, Stamatiou K, Trinchieri A. Green tea catechins for chemoprevention of prostate cancer in patients with histologically-proven HG-PIN or ASAP. Concise review and meta-analysis. *Arch Ital Urol Androl*. Oct 2 2019;91(3)doi:10.4081/aiua.2019.3.153



8. Anexos

8.1. Tablas

8.1.1. **Tabla I.** Lista de compuestos polifenólicos presentes en la vid y sus frutos.

Tabla I. Compuestos polifenólicos candidatos a estar presentes en los mostos de uva. Los compuestos están ordenados de manera creciente en base al tamaño molecular. No-F = no flavonoide. F = flavonoide.

Tipo	Familia polifenólica	Nombre	Fórmula química	Masa molecular [g/mol]
No-F	Fenoles	Resorcinol	C ₆ H ₆ O ₂	110,11064
No-F	Furfural	5-Metilfurfural	C ₆ H ₆ O ₂	110,11064
No-F F	Ácidos carboxílicos	Ácido hexanoico	C ₆ H ₁₂ O ₂	116,15828
No-F	Ácidos carboxílicos	Ácido succínico	C ₄ H ₆ O ₄	118,08804
No-F	Pequeños ácidos	Ácido benzoico	C ₇ H ₆ O ₂	122,12134
No-F	Furfural	5-Hidroximetil furfural	C ₆ H ₆ O ₃	126,11004
No-F	Pequeños ácidos	Ácido málico	C ₄ H ₆ O ₅	134,08744
No-F	Ácidos hidroxibenzoicos	Ácido 4-Hidroxibenzoico	C ₇ H ₆ O ₃	138,12074
No-F	Ácidos hidroxibenzoicos	Ácido salicílico	C ₇ H ₆ O ₃	138,12074
No-F	Feniletanoides	Tirosol	C ₈ H ₁₀ O ₂	138,16380
No-F	Fenoles	2-Nitrofenol	C ₆ H ₅ NO ₃	139,10880
No-F	Fenoles	3-Nitrofenol	C ₆ H ₅ NO ₃	139,10880
No-F	Fenoles	4-Nitrofenol	C ₆ H ₅ NO ₃	139,10880
No-F	Pequeños ácidos	Ácido octanoico	C ₈ H ₁₆ O ₂	144,21144
No-F	Propanoides fenólicos	Cumarina	C ₉ H ₆ O ₂	146,14274
No-F	Ácidos carboxílicos	Ácido cinnámico	C ₉ H ₈ O ₂	148,15862
No-F	Pequeños ácidos	Ácido tartárico	C ₄ H ₆ O ₆	150,08684
No-F	Aldehídos fenólicos	Vainillina	C ₈ H ₈ O ₃	152,14732
No-F	Ácidos hidroxibenzoicos	Ácido Alfa resorcílico	C ₇ H ₆ O ₄	154,12014
No-F	Ácidos hidroxibenzoicos	Ácido beta resorcílico	C ₇ H ₆ O ₄	154,12014
No-F	Ácidos hidroxibenzoicos	Ácido gamma resorcílico	C ₇ H ₆ O ₄	154,12014
No-F	Ácidos hidroxibenzoicos	Ácido genístico	C ₇ H ₆ O ₄	154,12014
No-F	Fenoles	Ácido O-Pirocatecuico	C ₇ H ₆ O ₄	154,12014

No-F	Ácidos fenólicos	Ácido protocatecuico	C ₇ H ₆ O ₄	154,12014
No-F	Fenil propanoides	Umbeliferona	C ₉ H ₆ O ₃	162,14214
No-F	Ácidos hidroxicinámicos	Ácido o-cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	164,15802
No-F	Benzaldehídos	Veratraldehido	C ₉ H ₁₀ O ₃	166,17390
No-F	Ácidos hidroxibenzoicos	Ácido orsellínico	C ₈ H ₈ O ₄	168,14672
No-F	Ácidos hidroxibenzoicos	Ácido vanílico	C ₈ H ₈ O ₄	168,14672
No-F	Ácidos hidroxibenzoicos	Ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	170,11954
No-F	Fenil propanoides	Esculetina	C ₉ H ₆ O ₄	178,14154
No-F	Hidroxicinamatos	Ácido cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	180,15742
No-F	Estilbenos	Cis/trans-estilbeno	C ₁₄ H ₁₂	180,24508
No-F	Fenoles	Syringaldehido	C ₉ H ₁₀ O ₄	182,17330
No-F	Carotenoides	Damascenona	C ₁₃ H ₁₈ O	190,28142
No-F	Pequeños ácidos	Ácido cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	192,12352
No-F	Hidroxicinamatos	Ácido quínico	C ₇ H ₁₂ O ₆	192,16658
No-F	Fenil propanoides	Escopoletina	C ₁₀ H ₈ O ₄	192,16812
No-F	Carotenoides	Alfa ionona	C ₁₃ H ₂₀ O	192,29730
No-F	Ácidos hidroxicinámicos	Ácido ferúlico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,18400
F	Xantonas	Xantona	C ₁₃ H ₈ O ₂	196,20142
No-F	Ácido hidroxibenzoico	Ácido siríngico	C ₉ H ₁₀ O ₅	198,17270
F	Xantonas	Xantidrol	C ₁₃ H ₁₀ O ₂	198,21730
No-F	Pequeños ácidos	Ácido lipoico	C ₈ H ₁₄ O ₂ S ₂	206,32556
No-F	Ácidos hidroxicinámicos	Etil cafeato	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	208,21058
F	Chalconoides	Cis/trans chalcona	C ₁₅ H ₁₂ O	208,25518
Non-F	Propanoides fenólicos	6-tert-Butil-4-metilcumarina	C ₁₄ H ₁₆ O ₂	216,27564
F	Isoflavonoides	Isoflavona	C ₁₅ H ₁₀ O ₂	222,23870
No-F	Ácidos hidroxicinámicos	Ácido sinápico	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	224,20998
No-F	Estibeno	Cis/trans-Resveratrol	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	228,24328
No-F	Polibenzona	Chrisina	C ₁₈ H ₁₂	228,28788
No-F	Ácidos hidroxicinámicos	Ácido acetyl ferúlico	C ₁₂ H ₁₂ O ₅	236,22068
F	Flavan-3-ols	Flavan-3,4-diol	C ₁₅ H ₁₄ O ₃	242,26986
F	Antocianinas	Flavan-3,4-diol	C ₁₅ H ₁₄ O ₃	242,26986
No-F	Estilbenoides	Cis/trans Piceatannol	C ₁₄ H ₁₂ O ₄	244,24268
No-F	Estilbenoides	Piceatannol	C ₁₄ H ₁₂ O ₄	244,24268

No-F	Ácido carboxílico	Trolox	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	250,29032
F	Isoflavonas	Daidzein	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254,23750
F	Flavones	Chrysin	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254,23750
F	Antocianidinas	Apigeninidin	C ₁₅ H ₁₁ O ₄	255,24544
F	Flavanonas	Pinocembrina	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	256,25338
No-F	Estilbenos	Pterostilbeno	C ₁₆ H ₁₆ O ₃	256,29644
F	Flavonas	Tectochrisina	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	268,26408
F	Flavonoles	Galangina	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270,23690
F	Isoflavonas	Genisteina	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270,23690
F	Flavonas	Apigenina	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270,23690
F	Antocianidinas	Pelargonidina	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	271,24484
F	Flavanonas	Naringenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272,25278
F	Chalconoides	Floretina	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	274,26866
No-F	Fenol aldehído	Aldehíd-Protocatecuico	C ₁₃ H ₂₂ O ₃ Si ₂	282,48298
F	Flavonoles	Galangin-5-metileter	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284,26348
F	Isoflavonas	Biochanin a	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284,26348
F	Isoflavonas	Prunetina	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284,26348
F	Flavonas	Acacetina	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284,26348
F	Flavonoles	Fisetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,23630
F	Flavonoles	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,23630
F	Flavonole	Luteolina	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,23630
F	Antocianidina	Cianidina	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287,24424
F	Flavonoles	Aromadendrina	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288,25218
F	Flavonoles	Catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,26806
F	Flavonoles	Epicatequin galato	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,26806
F	Flavonoles	Cianidanol	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,26806
F	Flavonoles	Epicatequin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,26806
No-F	Hydroxicinnama tos	Trans-coutarato	C ₁₃ H ₁₀ O ₈₋₂	294,21370
No-F	Hydroxicinnama tos	Ácido coutárico	C ₁₃ H ₁₂ O ₈	296,22958
F	Chalconoides	Ácido p-cumaroil-tartárico	C ₁₃ H ₁₂ O ₈	296,22958
F	Isoflavonas	Tectorigenina	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300,26288
F	Antocianidinas	Peonidina	C ₁₆ H ₁₃ O ₆	301,27082
NF	Hidroxibenzoato	Ácido elágioc	C ₁₃ H ₆ O ₈	302,197
F	Flavonoles	Morina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,23570
F	Flavonoles	Quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,23570
F	Flavanonas	Hesperetina	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302,27876
F	Antocianidina	Delfinidina	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	303,24364
F	Flavonoles	Fisetin hidrato	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	304,25158
F	Flavanonoles	Taxifolina	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	304,25158
F	Flavonoles	Epigallocatechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	306,26746
F	Flavonoles	Gallocatechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	306,26746
F	Flavonoles	Gallocatechol	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	306,26746
F	Antocianidinas	Pelargonidina clorada	C ₁₅ H ₁₁ ClO ₅	306,69784
F	Flavonoles	Catequina	C ₁₅ H ₁₆ O ₇	308,28334
F	Flavonoles	Catequina hidratada	C ₁₅ H ₁₆ O ₇	308,28334
No-F	Fenil propanoides	Warfarina	C ₁₉ H ₁₆ O ₄	308,32794

No-F	Hidroxicinamatos	Ácido caftárico	C ₁₃ H ₁₂ O ₉	312,22898
F	Flavonoles	Galangin trimetil-eter	C ₁₈ H ₁₆ O ₅	312,31664
F	Flavonoles	Isorhamnetina	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316,26228
F	Flavonoles	Rhamnetina	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316,26228
F	Antocianidinas	Petunidina	C ₁₆ H ₁₃ O ₇	317,27022
F	Flavonoles	Myricetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318,23510
F	Flavonoles	Morin hidrato	C ₁₅ H ₁₂ O ₈	320,25098
F	Antocianidinas	Leukoefdin	C ₁₅ H ₁₄ O ₈	322,26686
F	Antocianidinas	Cianidin clorado	C ₁₅ H ₁₁ ClO ₆	322,69724
No-F	Ácidos hidroxicinámicos	Ácido fertárico	C ₁₄ H ₁₄ O ₉	326,25556
F	Antocianidinas	Malvidina	C ₁₇ H ₁₅ O ₇	331,29680
No-F	Fenil propanoides	Dicumarol	C ₁₉ H ₁₂ O ₆	336,29498
F	Antocianidinas	Peonidina clorad	C ₁₆ H ₁₃ ClO ₆	336,72382
F	Isoflavonas	Daidzein diacetato	C ₁₉ H ₁₄ O ₆	338,31086
F	Antocianidinas	Delfinidin 3-cloro	C ₁₅ H ₁₁ ClO ₇	338,69664
No-F	Lignano	Lignanos	C ₂₀ H ₂₂ O ₅	342,38568
No-F	Feniltanoide	Tyrosol Sinapate	C ₁₉ H ₂₀ O ₆	344,35850
No-F	Fenil propanoides	Dafnoretina	C ₁₉ H ₁₂ O ₇	352,29438
F	Antocianidinas	Petunidina clorada	C ₁₆ H ₁₃ ClO ₇	352,72322
No-F	Hdroxicinamatos	Ácido clorogénico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,30872
No-F	Fenil propanoide	Secoisolariciresinol	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	362,41684
No-F	Estilbenoide	Resveratrolósido	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	390,38388
No-F	Estilbenoide glucósido	Cis-Polidatina	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	390,38388
No-F	Estilbenoide glucósido	Polidatina	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	390,38388
F	Isoflavonas	Daidzin	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	416,37810
F	Antocianidina	Pelargonidin 3-glucoside	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	433,38544
F	Chalconoides	Florizin	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	436,40926
F	Flavanoles	Catequin-galato	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	442,37232
F	Flavanoles	Catequin- 3-o-galato	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	442,37232
F	Flavanoles	Epicatequin 3-galato	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	442,37232
F	Flavonoles	Astragalina	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448,37690
F	Flavonoles	Quercitrina	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448,37690
F	Flavonas	Cinarosida	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448,37690
F	Antocianinas	Crisantemina	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449,38484
F	Antocianinas	Kuromanina	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449,38484
F	Antocianidinas	Ideaina	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449,38484
F	Flavanonoles	Astilbina	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	450,39278
No-F	Estilbenoides	A-Viniferina	C ₂₈ H ₂₂ O ₆	454,47068
No-F	Estilbenoides	E-Viniferina	C ₂₈ H ₂₂ O ₆	454,47068
F	Flavanoles	Epigalocatequin-galato	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	458,37172
F	Flavanoles	Galocatequin-galato	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	458,37172
F	Flavonoles	Quercitin-3-glucosido	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	463,36836

F	Flavonoles	Hiperosido	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,37630
F	Flavonoles	Isoquercitrina	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,37630
F	Antocianidina	Delfinidin 3-glucosido	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	465,38424
F	Flavonoles	Rhamnetin 3-o-glucoside	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	478,40288
F	Antocianidinas	Petunidin 3-glucosido	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₂	479,41082
F	Flavonoles	Miricetin 3-galactosido	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	480,37570
F	Flavonoles	Silibina	C ₂₅ H ₂₂ O ₁₀	482,43618
F	Antocianinas	Asterina	C ₂₁ H ₂₁ ClO ₁₁	484,83784
F	Antocianinas	Kuromanin clorado	C ₂₁ H ₂₁ ClO ₁₁	484,83784
F	Antocianinas	Oenina	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂	493,43740
F	Antocianidina	Malvidin-3-glucosido	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂	493,43740
F	Antocianidinas	Delfinidin-3-galactosido	C ₂₁ H ₂₁ ClO ₁₂	500,83724
F	Antocianidinas	Mirtillina	C ₂₁ H ₂₁ ClO ₁₂	500,83724
F	Antocianinas	Oenin clorado	C ₂₃ H ₂₅ ClO ₁₂	528,89040
No-F	Feniltanoides	Oleuropeina	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃	540,51378
F	Proantocianidin as	Proantocianidina a1	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	576,50436
F	Proantocianidin as	Proantocianidina a2	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	576,50436
F	Flavonas	Isorhoifolina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	578,51870
F	Proantocianidin as	Proantocianidinab1	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	578,52024
F	Proantocianidin as	Proantocianidinab2	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	578,52024
F	Flavanonas	Naringina	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	580,53458
No-F	Ácidos hidroxicinámicos	Ácido cis-cutárico	C ₂₅ H ₄₄ O ₈ Si ₄	584,95406
F	Flavonoles	Proantocianidina	C ₃₁ H ₂₈ O ₁₂	592,54682
No-F	Ácidos hidroxicinámicos	Oryzanol	C ₄₀ H ₅₈ O ₄	602,88612
F	Flavonoles	Epicatequin 3,5-digalato	C ₂₉ H ₂₂ O ₁₅	610,47598
F	Flavonols	Rutina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,51750
F	flavanones	Hesperidina	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	610,56056
F	Chalconoides	Ácido p-cumaroil tartárico- ester glucosídico	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₈	620,51078
No-F	Ácidos cíclicos	Ácido pítico	C ₆ H ₁₈ O ₂₄ P ₆	660,03529
F	Proantocianidin as	Procianidina b2 3'-o-galato	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	730,62450
No-F	Estibenoide glucósido	Polidatina-6 metil,	C ₃₈ H ₇₀ O ₈ Si ₆	823,47060

8.1.2. Tabla II. Parámetros de ionización y fragmentación de los polifenoles seleccionados para su análisis en las muestras de mosto.

Tabla II. Selección de 56 polifenoles presentes en uva con los parámetros más relevantes para su identificación y análisis mediante espectrometría de masas. Q1, relación carga/masa (m/z) del polifenol que se desea analizar. Q3, indica el fragmento mayoritario y estable. El tiempo en milisegundos hace referencia al tiempo de análisis CE es la energía de colisión que ocurre en el Q2. DP (declustering potential), potencial de entrada; CXP (collision cell exit potential) potencial de salida, ambos valores hacen referencia a parámetros de energía de estabilización de MS para seleccionar tamaños adecuados y focalizarlos al Q3. EP (entrance potential), potencial en Qo. RB (referencia bibliográfica de la que se procede la información).

Nº	Compuesto	Q1	Q3	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)	RB.
1	4-Metilumbeliferona	174,9	133,0	-135,0	-10,0	-28,0	-9,0	
			119,1	-135,0	-10,0	-36,0	-7,0	
2	Ácido aminobenzoico	137,1	77,0	56,0	10,0	29,0	10,0	
			94,0	56,0	10,0	19,0	8,0	
3	Ácido benzoico	122,9	79,0	36,0	10,0	17,0	12,0	
			51,0	36,0	10,0	51,0	24,0	
4	Ácido cafeico	178,9	135,0	-50,0	-10,0	-22,0	-9,0	
			107,0	-115,0	-10,0	-30,0	-7,0	
5	Ácido caftárico	312,2	149,0	-100,0	-	-126,0	-10,0	
6	Ácido clorogénico	355,1	163,0	46,0	10,0	21,0	10,0	
			89,0	46,0	10,0	75,0	14,0	
7	Ácido cumárico	162,9	119,0	-90,0	-10,0	-20,0	-7,0	
			93,0	-30,0	-10,0	-30,0	-5,0	
8	Ácido dihidroxibenzoico	152,9	109,0	-75,0	-10,0	-20,0	-7,0	
			109,0	-75,0	-10,0	-20,0	-13,0	
9	Ácido elágico	303,2	285,2	100,0	10,0	27,0	5,0	
			210,9	100,0	10,0	27,0	5,0	
10	Ácido fertárico	325,1	130,9	100,0	10,0	27,0	5,0	
			193,0	-	-	-	-	
11	Ácido ferúlico	195,0	176,9	21,0	10,0	11,0	10,0	
			89,0	21,0	10,0	41,0	10,0	
12	Ácido gálico	170,1	124,9	-110,0	-10,0	-20,0	-7,0	
			79,0	-110,0	-10,0	-30,0	-11,0	
13	Ácido lipoico	205,1	171,0	-30,0	-4,0	-14,0	-1,0	
			205,1	-25,0	-4,0	-5,0	-15,0	
14	Ácido protocatecuico	152,9	90,9	-75,0	-10,0	-32,0	-13,0	
16	Ácido salicílico	136,9	93,1	-15,0	-10,0	-22,0	-5,0	
			64,9	-15,0	-10,0	-36,0	-11,0	
17	Ácido sinápico	223,0	163,9	-120,0	-10,0	-20,0	-9,0	
			192,9	-120,0	-10,0	-28,0	-11,0	
18	Ácido siríngico	199,0	140,0	16,0	10,0	21,0	10,0	
			155,1	16,0	10,0	13,0	10,0	
19	Ácido vanílico	166,9	137,0	-140,0	-10,0	-12,0	-9,0	
			109,1	-140,0	-10,0	-16,0	-7,0	
20	Apigenina	271,0	253,1	100,0	10,0	14,0	10,0	

			239,3	100,0	10,0	20,0	10,0	
21	Astilbina	451,1	305,1	147,1	-	85,0	-	219
22	Catequina	291,0	139,0	16,0	10,0	21,0	10,0	
			123,0	16,0	10,0	19,0	8,0	
23	Chrisina	223,0	142,9	-170,0	-10,0	-36,0	-9,0	214
			209,1	-170,0	-10,0	-30,0	-11,0	
24	Coniferaldehido	177,0	134,0	-30,0	-10,0	-28,0	-9,0	
			160,8	-30,0	-10,0	-28,0	-11,0	
25	Cumarina	165,1	147,0	150,0	10,0	65,0	-	223
26	Daidzeina	255,2	199,0	-	-	35,0	-	222
27	Epicatequina	291,0	138,9	36,0	10,0	21,0	8,0	
			123,0	36,0	10,0	21,0	8,0	
28	Epigallocatequina gallato	457,0	169,0	-165,0	-10,0	-20,0	-11,0	214
			125,0	-165,0	-10,0	-52,0	-9,0	
29	Escopoletina	192,2	193,2	132,9	-10,0	-26,0	-11,0	215
30	Esculetina	175,9	133,1	-100,0	5,0	-25,0	-10,0	224
			105,0	-100,0	5,0	-21,0	-10,0	
31	Etil galato	197,0	123,9	-135,0	-10,0	-20,0	-	226
32	Fisetina	285,1	134,9	-50,0	-7,0	-28,0	-15,0	218
33	Floretina	274,3	273,0	168,0	106,0	-	-	228
34	Floridzina	579,0	436,4	-	-	-	-	
35	Galangina	271,0	153,0	176,0	10,0	43,0	10,0	
			115,1	176,0	10,0	59,0	8,0	
36	Hesperidina	611,2	303,0	51,0	10,0	31,0	16,0	214
			153,1	51,0	10,0	67,0	10,0	
37	Isorhamnetina	315,0	300,0	-225,0	-10,0	-28,0	-15,0	
			150,9	-225,0	-10,0	-38,0	-9,0	
38	Kaempferol	285,0	229,0	-80,0	-10,0	-20,0	-	216
			255,0	-80,0	-10,0	-25,0	-	
		286,9	153,0	111,0	10,0	43,0	10,0	
			268,9	100,0	10,0	17,0	9,0	214
39	Luteolina	286,9	153,0	100,0	10,0	17,0	9,0	
			68,9	111,0	10,0	89,0	10,0	
40	Metill gallate	183,0	124,0	-98,0	-10,0	-30,0	-9,0	217
41	Miricetina	317,0	271,0	-75,0	-10,0	-20,0	-	216
			271,0	-75,0	-10,0	-20,0	-	
42	Naringenina	271,0	151,0	-130,0	-10,0	-24,0	-25,0	
			119,0	-130,0	-10,0	-34,0	-11,0	
43	Naringina	579,0	271,0	-255,0	-10,0	-42,0	-13,0	
			151,0	-255,0	-10,0	-48,0	-9,0	214
44	Pinobanksin	271,0	150,9	-140,0	-10,0	-24,0	-9,0	
			119,5	-140,0	-10,0	-32,0	-7,0	
45	Pinocembrina	256,3	153,0	96,0	10,0	33,0	10,0	
			76,9	96,0	10,0	73,0	10,0	
46	Propil galato	211,0	123,9	-140,0	-10,0	-21,0	-	226
47	Pterostilbeno	256,3	-	-50,0	-	-35,0	-	227
			-	43,0	-	35,0	-	
48	Pterostilbeno dímero	511,2	-	-	-	35,0	-	
49	Pueraina	417,1	296,9	20,0	10,0	35,0	10,0	222
50	Quercetina	301,0	150,9	-50,0	-10,0	-28,0	-9,0	214

			121,0	-50,0	-10,0	-34,0	-7,0	
		301,0	151,0	-85,0	-10,0	-20,0	-	216
			271,0	-85,0	-10,0	-25,0	-	
		301,1	150,9	-50,0	-7,0	-28,0	-15,0	218
51	Rutina	609,0	299,9	-230,0	-10,0	-48,0	-15,0	
			270,9	-230,0	-10,0	-70,0	-9,0	
52	Sinapaldehido	206,9	177,0	-20,0	-10,0	-26,0	-11,0	214
			148,9	-20,0	-10,0	-34,0	-9,0	
53	Siringaldehido	183,0	123,1	41,0	10,0	17,0	8,0	
			77,0	41,0	10,0	31,0	10,0	
54	Taxifolina	304,3	259,1	-70,0	-10,0	-10,0	-3,0	
		303,0	285,0	-70,0	-10,0	-10,0	-3,0	
55	<i>trans</i> -Resveratrol	228,2	91,0	75,0	10,0	32,0	7,0	219
			135,0	75,0	10,0	21,0	10,0	
			107,0	75,0	10,0	32,0	8,0	
56	Viniferina	455,1	361,2	-	-	-	-	
			361,2	-	-	-	-	
		453,0	410,9	-45,0	-9,0	-36,5	-9,0	220

8.1.3. Tabla III. Clasificación de los distintos indicadores de apoptosis en los artículos incluidos en el meta-análisis.

Tabla III. Clasificación de los distintos indicadores de apoptosis en los artículos incluidos en el meta-análisis.

		Indicadores de apoptosis													Total		
		Efecto apoptótico Cas-3 y Cas-7	Actividad mitocondrial	Apoptosis temprana (Anexin V-FITC)	Cinética del ciclo celular (Go/G ₁ /S/M)	Capacidad Antioxidante	Análisis Immunofluorescencia	Bcl-2	WB análisis of p53	Producción endógena NO ₂	Caspasas apoptóticas 8 y 9	Especies reactivas de oxígeno (ROS)	Expresión de CD14 y CD11b	Daño DNA		NBT	Proteínas tipo quimiopripsina
Artículos	Can <i>et al</i> 2012 ²⁴²																3
	Billard <i>et al</i> 2002 ²⁴¹																3
	Katsuzaki <i>et al</i> 2003 ²⁴⁹																1
	Chen <i>et al</i> 2005 ²⁴³																1
	Mertens-Talcott <i>et al</i> 2008 ²⁵²																3
	Hu <i>et al</i> 2006 ²⁴⁸																2
	Gao <i>et al</i> 2009 ²⁴⁵																4
	Mertens-Talcott <i>et al</i> 2003 ¹⁸¹																4
	Wang <i>et al</i> 2012 ²⁵⁵																4
	Liao <i>et al</i> 2012 ²⁵¹																6
	Ghorbani <i>et al</i> 2015 ²⁴⁶																1
	Siedlecka Kroplewska <i>et al</i> 2012 ²⁶³																5
	Sharif <i>et al</i> 2010 ²⁵³																4
	Gokbulut <i>et al</i> 2013 ²⁴⁷																3
	Ferry-Dumazet <i>et al</i> 2002 ¹⁷¹																3
	Espino <i>et al</i> 2013 ²⁶²																3
	León-González <i>et al</i> 2017 ²⁶¹																6
Total	13	6	9	8	1	3	2	3	1	2	6	2	1	1	1		

8.2. Figuras

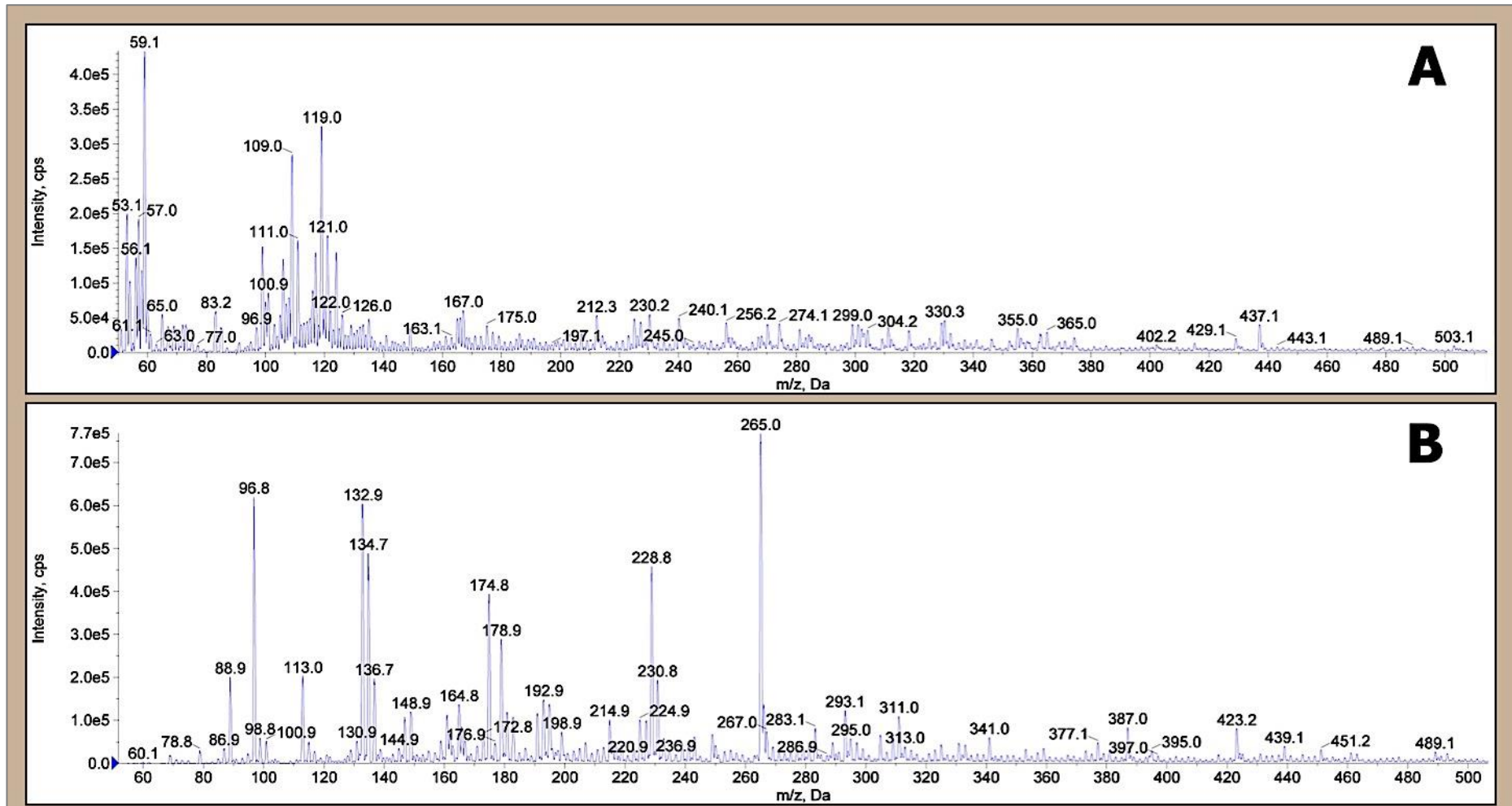


Figura I. Espectros de MS del extracto del mosto fresco Gewürztraminer obtenidos en el modo de ionización positivo (A) y modo de ionización negativo (B).

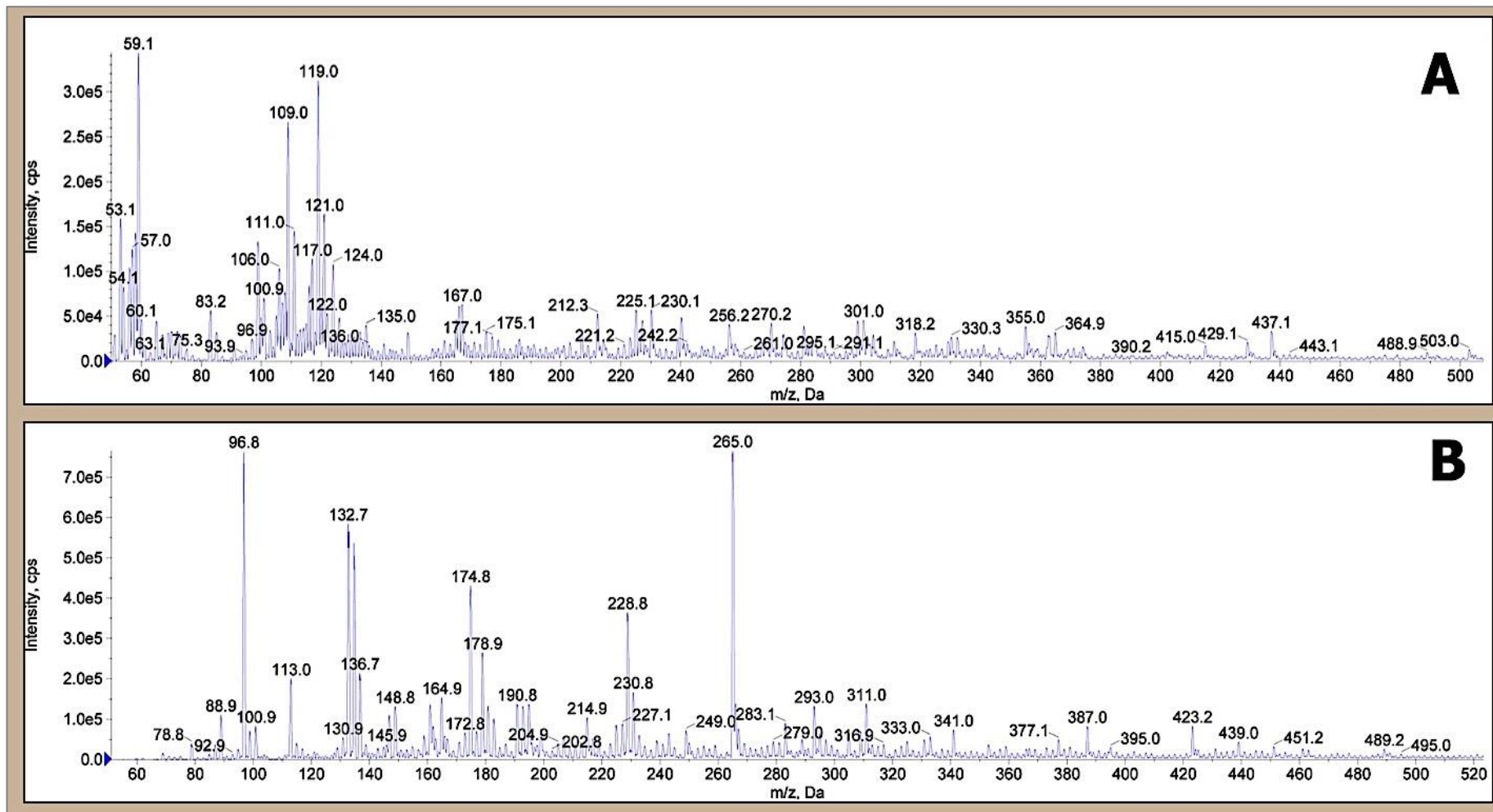


Figura II. Espectros de MS del extracto del mosto fresco Sauvignon blanc obtenidos en el modo de ionización positivo (A) y modo de ionización negativo(B).

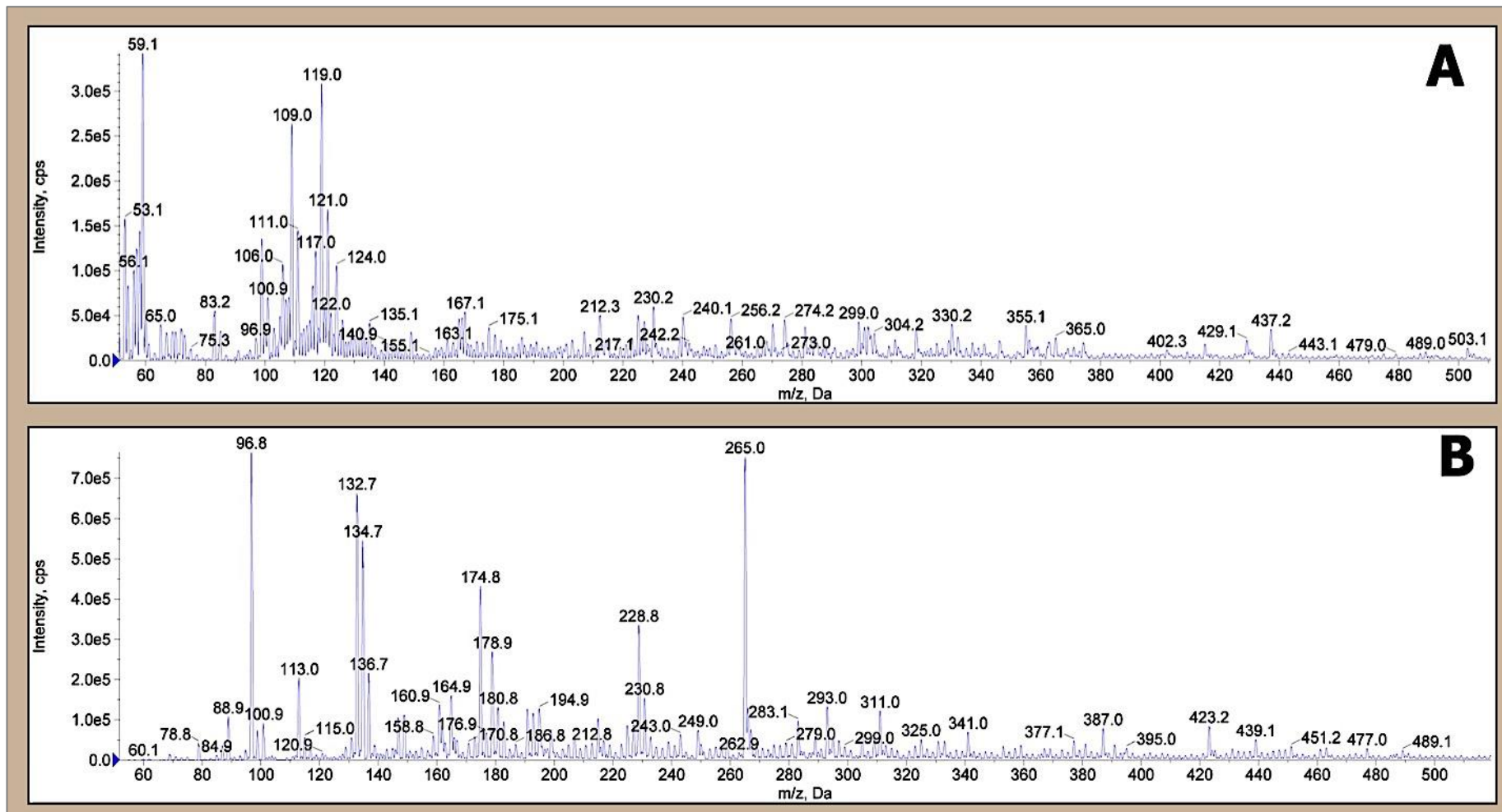


Figura III. Espectros de MS del extracto del mosto fresco Verdejo obtenidos en el modo de ionización positivo (A) y modo de ionización negativo (B).

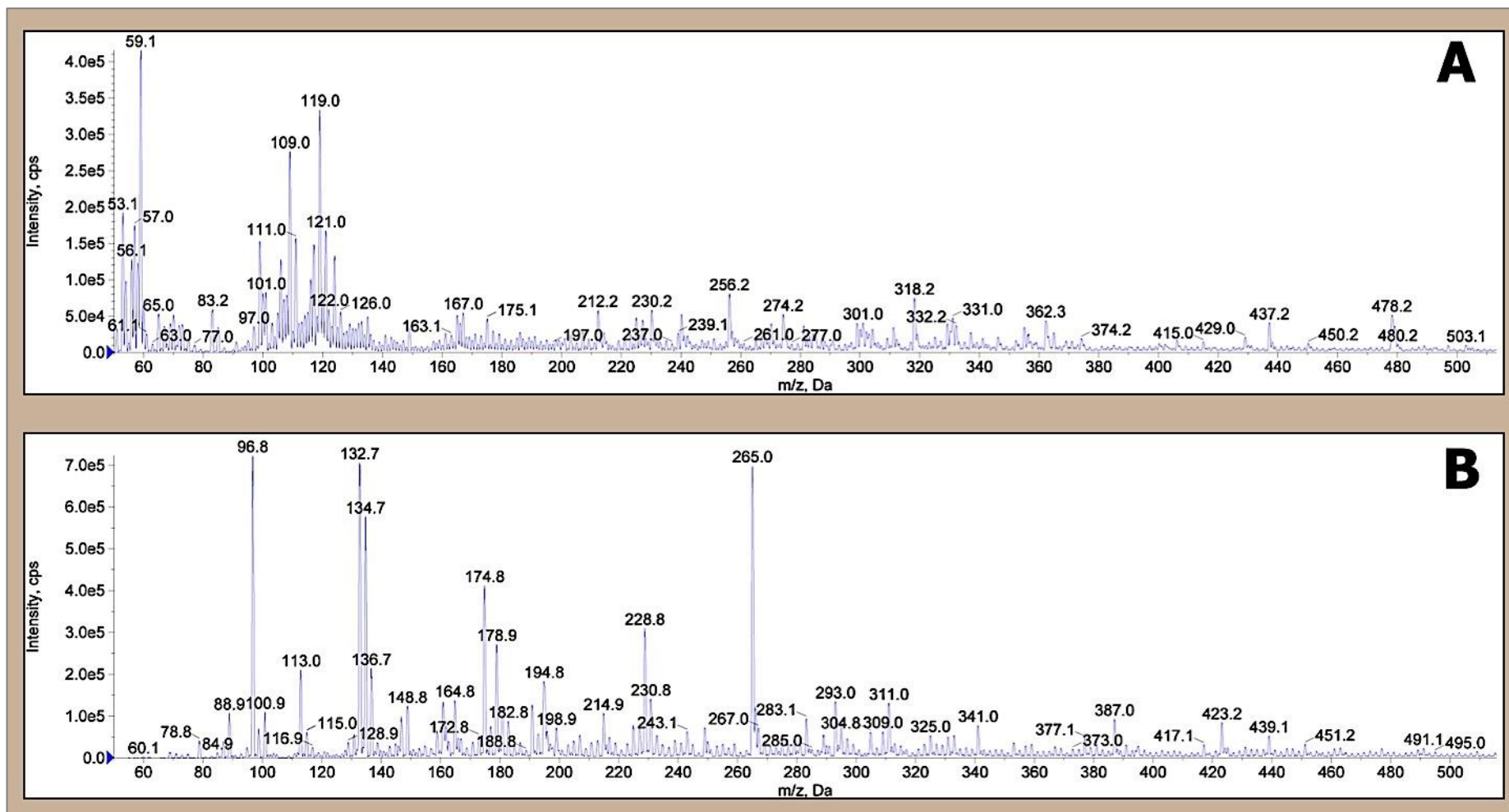


Figura IV. Espectros de MS del extracto del mosto fresco Tempranillo obtenidos en el modo de ionización negativo (A) y modo de ionización positivo (B)



