

# TRABAJO FIN DE MASTER



**UCAM**

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

## FACULTAD DE FARMACIA Y NUTRICIÓN

*Máster Universitario en Nutrición y Seguridad  
Alimentaria*

---

Evaluación de la bioaccesibilidad de galatos de alquilo  
de subproductos vitivinícolas tras la simulación *in vitro*  
de la digestión gastrointestinal.

*Autora:*

*Maravillas Fernández Amor*

*Director/a:*

Dr. Sonia Medina Escudero  
Dr. José Ramón Acosta Motos

*Murcia, julio de 2023*



## **Agradecimientos**

En primer lugar, agradecer la ayuda para Contratos Ramón y Cajal (RYC2020-029521-I) financiada por MCIN/AEI /10.13039/501100011033 y por el Fondo Social Europeo (FSE) invierte en tu futuro, al darme la oportunidad de realizar este Trabajo de Fin de Máster.

Me gustaría expresar mi gratitud hacia mis tutores Sonia Medina Escudero, por la oportunidad y confianza para llevar a cabo este trabajo y mostrarme mucho más sobre el mundo de la investigación, y a Jose Ramón Acosta Motos, por la aceptación de la tutoría, la ayuda y el tiempo dedicado.

En especial, a mi familia por darme la oportunidad de seguir formándome y por apoyarme en todo momento.



## Listado de Abreviaturas

**ACN**, Acetonitrilo

**ACP**, Análisis de componentes principales

**ADN**, Ácido desoxirribonucleico

**CPs**, Componentes principales

**DE**, Desviación estándar

**DOP**, Denominación de Origen Protegida

**EFSA**, Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

**LC-MS**, Cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas

**LOD**, Límite de detección

**LOQ**, Límite de cuantificación

**MRM**, Monitorización de múltiples reacciones

**OIV**, Organización Internacional de la Viña y el Vino

**PVDE**, Polifluoruro de vinilideno

**ROS**, Especies reactivas de oxígeno

**UHPLC**, Cromatografía líquida de alto rendimiento

**UE**, Unión Europea



## ÍNDICE

<b>Índice de tablas.....</b>	<b>11</b>
<b>Índice de figuras.....</b>	<b>13</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
2.1. Objetivo general.....	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
<b>3. ANTECEDENTES.....</b>	<b>21</b>
3.1. Actividad vitivinícola y aprovechamiento y valorización de subproductos enológicos.....	21
3.2. Compuestos fenólicos y su distribución en subproductos enológicos.....	24
3.2.1. Ácido gálico.....	27
3.2.2. Derivados esterificados de ácido gálico: Galatos de alquilo.....	28
3.2.3. Funcionalidad de compuestos fenólicos y sus derivados.....	30
3.3. Aplicaciones para la industria alimentaria.....	32
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>35</b>
4.1. Extracción y análisis de galatos de alquilo en matrices alimentarias de origen vegetal.....	35
4.1.1. Sustancias químicas y reactivos.....	35
4.1.2. Matrices de origen vegetal.....	35
4.1.3. Extracción de galatos de alquilo en subproductos vitivinícolas.....	36





4.2. Análisis de la bioaccesibilidad de galatos de alquilo mediante un modelo estático de digestión <i>in vitro</i> .....	36
4.2.1. Sustancias químicas y reactivos.....	36
4.2.2. Procedimiento de simulación <i>in vitro</i> de digestión gastrointestinal de subproductos vitivinícolas.....	36
4.2.3. Simulación de fluido gástrico.....	37
4.2.4. Simulación del fluido intestinal.....	38
4.2.5. Análisis de galatos de alquilo.....	39
4.2.6. Análisis estadístico.....	40
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>43</b>
5.1. Contenido en ácido gálico y ésteres alquílicos en los diferentes subproductos enológicos analizados .....	44
5.2. Bioaccesibilidad de galatos de alquilo.....	48
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>59</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>61</b>



## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Volumen y concentración de reactivos para la preparación de 500 mL de fluido gástrico simulado.....	38
<b>Tabla 2.</b> Volumen y concentración de reactivos para la preparación de 500 mL de fluido intestinal simulado.....	38
<b>Tabla 3.</b> Peso molecular y principales transiciones de cuantificación y confirmación de ácido gálico y sus derivados esterificados analizados en modo de ionización negativo.....	40
<b>Tabla 4.</b> Contenido (ng/g) de ácido gálico y sus derivados esterificados tras la simulación de la digestión intestinal <i>in vitro</i> en muestras de bagazo.....	50
<b>Tabla 5.</b> Contenido (ng/g) de ácido gálico y sus derivados esterificados tras la simulación de la digestión intestinal <i>in vitro</i> en muestras de lías.....	53
<b>Tabla 6.</b> Contenido (ng/g) de ácido gálico y sus derivados esterificados tras la simulación de la digestión intestinal <i>in vitro</i> en muestras de raspón.....	56



## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Destino de la uva producida a nivel mundial.....	21
<b>Figura 2.</b> Residuos orgánicos generados durante la vinificación.....	22
<b>Figura 3.</b> Proceso de elaboración del vino y subproductos generados en cada etapa.....	23
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática de la diversidad de compuestos fenólicos identificados en raspón de uva, orujo de uva y lías de vino.....	26
<b>Figura 5.</b> Estructura molecular del ácido gálico.....	27
<b>Figura 6.</b> Ésteres alquílicos del ácido gálico.....	30
<b>Figura 7.</b> Funcionalidad (bioaccesibilidad, biodisponibilidad y bioactividad) de los compuestos presentes en los alimentos.....	31
<b>Figura 8.</b> Aplicación de los subproductos del vino en la industria alimentaria.....	33
<b>Figura 9.</b> Subproductos enológicos usados para el desarrollo del Trabajo Fin de Máster.....	35
<b>Figura 10.</b> Subproductos enológicos liofilizados usados para la evolución de la bioaccesibilidad tras la simulación <i>in vitro</i> de la digestión gastrointestinal.....	37
<b>Figura 11.</b> Fracción bioaccesible obtenida tras la simulación estática <i>in vitro</i> de digestión gástrica (A), intestinal (B) y gastrointestinal (C) de lías de vino.....	39
<b>Figura 12.</b> Cromatograma UHPL-QqQ-MS/MS correspondiente a ácido gálico y sus derivados alquílicos.....	43
<b>Figura 13.</b> Contenido en ácido gálico y ésteres alquílicos (ng/g) en los diferentes subproductos enológicos analizados.....	44



**Figura 14.** Análisis de componentes principales dónde se muestra la relación entre los tres materiales vegetales (bagazo, lías y raspón) y los siete analitos estudiados; ácido gálico (AG), galato de metilo (MG), galato de etilo (EG), galato de propilo (PG), galato de butilo (BG), galato de octilo (OG) y galato de dodecilo (DG).....48





## 1. INTRODUCCIÓN

La elaboración de vino es una de las actividades agrícolas más importantes a nivel mundial, *por ende*, también genera grandes cantidades de subproductos, principalmente residuos orgánicos entre los que se incluyen los raspones, los orujos o el bagazo. Estos subproductos son matrices naturales caracterizadas por un alto contenido en nutrientes y otras sustancias que no son nutrientes, como son los compuestos fenólicos, que presentan propiedades bioactivas beneficiosas para la salud humana, pudiéndose aprovechar su aplicación como ingredientes tecnológicos o suplemento dietético.

El ácido gálico es uno de los ácidos fenólicos más abundantes en vino y en subproductos enológicos y, por tanto, de gran interés para la industria agroalimentaria debido a sus múltiples actividades biológicas y tecnológicas. No obstante, debido a su limitada solubilidad en medios lipídicos, actualmente se está investigando el aislamiento y la síntesis química de compuestos que mantengan la bioactividad intrínseca del compuesto fenólico nativo pero que presenten un mayor carácter lipofílico, contribuyendo favorablemente a la bioactividad. En este contexto, se ha demostrado que la incorporación de un acilo de longitud variable (C1-C12) en la estructura del ácido fenólico, genera galatos de alquilo, moléculas más lipofílicas, sin que esta incorporación afecte a la actividad biológica propia del grupo fenol.

Sin embargo, dada la limitada información disponible sobre los mecanismos de digestión y absorción *in vivo* de los galatos de alquilo, la aplicación práctica de dichos ésteres alquílicos como ingredientes funcionales en alimentos es limitada. Actualmente, solo existen evidencias científicas llevadas a cabo en los últimos años, en modelos *in vitro* de simulación gastrointestinal, que aportan información muy útil sobre la estabilidad, bioaccesibilidad y biodisponibilidad de galatos de alquilo sintetizados químicamente, observándose que el grado de hidrólisis, por acción de las enzimas digestivas, está correlacionado negativamente con la longitud de la cadena alquílica. Asimismo, se ha demostrado que los galatos de alquilo pueden alcanzar el colon, y ser metabolizados por la microbiota intestinal para producir ácido gálico libre, pudiendo influir en la liberación sostenida del ácido fenólico, manteniendo su actividad biológica en el cuerpo durante un

tiempo más prolongado con los consecuentes beneficios para la salud, dada la vida media corta que presenta el ácido gálico en el cuerpo humano. En la actualidad, no existen evidencias científicas sobre el mecanismo de absorción digestiva de los galatos de alquilo presentes en matrices alimentarias, por lo tanto, futuras investigaciones son necesarias para contribuir al avance del conocimiento sobre el metabolismo de dichos compuestos presentes en los alimentos y subproductos y sus mecanismos de absorción intestinal y funcionalidad.

De acuerdo con los antecedentes descritos anteriormente, en el siguiente Trabajo de Fin de Máster (TFM) se va a determinar el contenido de ácido gálico y sus derivados esterificados en diferentes subproductos enológicos (raspón y bagazo de uvas y lías de vino). Además, se estudiará la bioaccesibilidad de los galatos de alquilo, derivados esterificados del ácido gálico presentes en las matrices alimentarias, mencionadas anteriormente, tras la simulación *in vitro* de la digestión gastrointestinal.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo General**

El objetivo principal de este TFM consiste en evaluar la bioaccesibilidad de moléculas de ácido gálico libre y esterificado con alcoholes de distinta longitud de cadena alquílica procedentes de subproductos de la industria vitivinícola.

### **2.2. Objetivos Específicos**

El objetivo general citado anteriormente ha sido concretado en los siguientes objetivos específicos, que se corresponden con las etapas seguidas en la realización de este trabajo experimental:

- Determinar el contenido de ácido gálico y sus derivados esterificados en diferentes subproductos enológicos (raspón y bagazo de uva y lías de vino).

- Evaluar la bioaccesibilidad, según el residuo vitivinícola, de derivados alquílicos de ácido gálico mediante un modelo *in vitro* de simulación gastrointestinal.

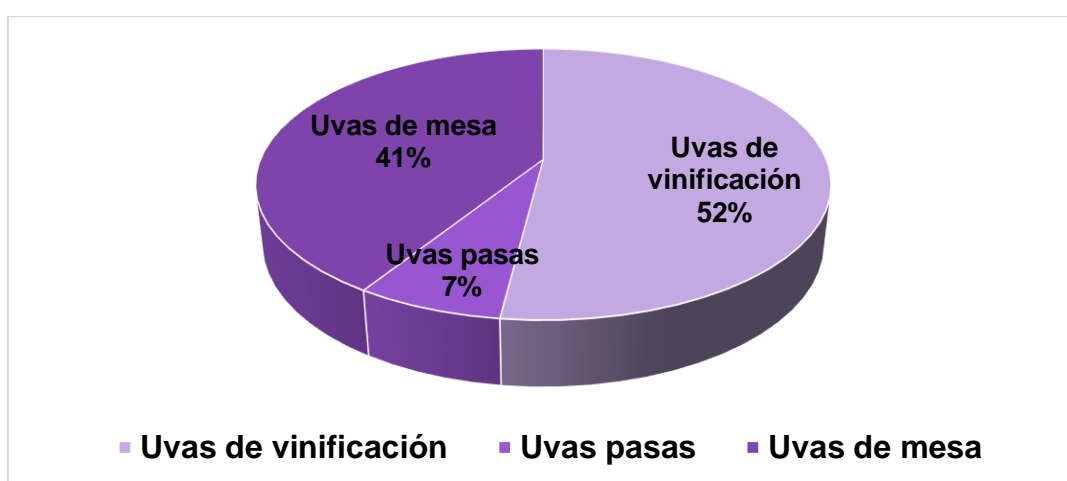


### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. Actividad vitivinícola y aprovechamiento y valorización de subproductos enológicos

La vid, cuyo nombre científico es *Vitis vinífera*, asignado por Luis Carlos Linneo, es una planta de amplio cultivo en todo el mundo, cuyo fruto, la uva, es empleada en la elaboración del vino, un tipo de bebida alcohólica que es la más consumida del mundo (Troilo *et al.*, 2020).

Tal y como se recoge en el Informe Estadístico sobre la Vitivinicultura Mundial de la OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino), en el año 2021 se produjeron 74.8 millones de toneladas de uvas en todo el mundo, de las cuales, 30.1 millones se destinaron a la producción de uvas de mesa (41%) y algo más de cinco millones a la producción de pasas (7%). El resto (52%) fueron destinadas a la vinificación (**Figura 1**), obteniéndose más de 262 millones de hectolitros de vino en todo el mundo (OIV, 2021).

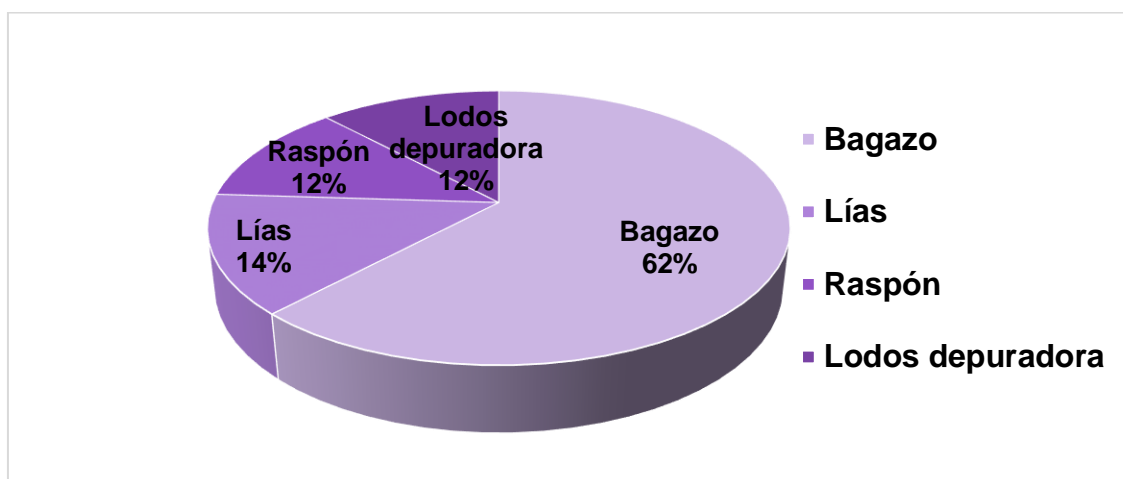


**Figura 1.** Destino de la uva producida a nivel mundial (OIV, 2021).

Por otro lado, en la Unión Europea (UE) se produce el 65% del vino a nivel mundial, siendo los tres principales países productores Italia, Francia y España. Es una actividad económica y cultural de gran importancia dentro de la UE, con un mercado valorado en miles de millones de euros y que cuenta con un crecimiento continuo año tras año (OIV, 2021).

Entre los principales países productores, España, es el país que alberga la mayor superficie mundial de viñas, con casi un millón de hectáreas destinadas a este cultivo, lo que representa el 13% de la superficie total, donde más del 95% de la uva cosechada en España se utiliza para elaborar vino, con una producción de 44.4 millones de hectolitros en el año 2021 (OIV, 2021).

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la elaboración de vino es una de las actividades agrícolas más importantes a nivel mundial, *por ende*, también genera grandes cantidades de residuos o subproductos, ocasionando problemas económicos y medioambientales para los productores que requieren encontrar vías alternativas para su revalorización (Maicas & Mateo, 2020). Los principales subproductos que se obtienen durante la vinificación son los residuos orgánicos (80-85%) constituidos principalmente por el orujo o bagazo (62%), las lías (14%), los lodos de depuradora (12%) y los raspones (12%). (**Figura 2**). (Ruggieri *et al.*, 2009).



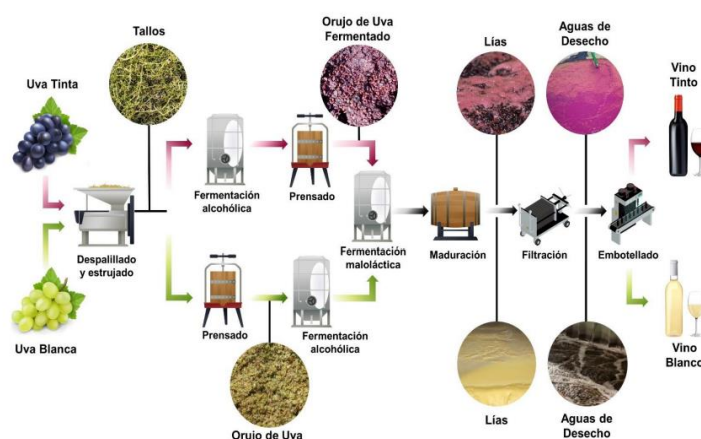
**Figura 2.** Residuos orgánicos generados durante la vinificación (Ruggieri *et al.*, 2009).

Además, los residuos de la industria del vino son materias primas ricas en compuestos orgánicos que actúan disminuyendo el pH de los subproductos, lo que impide su rápida biodegradación (Maicas & Mateo, 2020; Troilo *et al.*, 2021). A su vez, presentan carácter estacional, lo que conlleva una elevada acumulación en ciertos y cortos periodos de tiempo, teniendo repercusiones negativas en la sostenibilidad ambiental y económica (Maicas & Mateo, 2020).

Por estos motivos, la gestión eficaz de los subproductos de vinificación se ha convertido en un requisito primordial en la industria vitivinícola, a través de la implementación de un modelo de economía circular, a diferencia de la economía lineal, modelo económico que apunta a reducir al máximo la producción de residuos, así como optimizar y prolongar el uso de los recursos biológicos para proporcionar bienes y servicios en todos los sectores económicos de manera sostenible (Maicas & Mateo, 2020; Wohlgemuth *et al.*, 2021).

Actualmente, las estrategias Española y Europea de Investigación e Innovación en el ámbito agroalimentario, tienen como objetivo para los próximos años, proteger el medio ambiente mediante la reducción de la generación de residuos, garantizando alimentos asequibles, saludables y sostenibles. En este contexto, el sector vitivinícola está asociado a un gran impacto medioambiental, debido a que los subproductos constituyen el 25 % del material procesado, una cifra preocupante en los principales países productores de vino, como España. En este sentido, existe una tendencia creciente a tratar estos subproductos no como residuos sino como nuevas materias primas (Estrategia Española de Economía Circular y Planes de Acción, s. f., 2023).

Los subproductos vitivinícolas se originan a lo largo de las diferentes etapas de elaboración y producción del vino (**Figura 3**), y presentan un desafío en términos de gestión y aprovechamiento. (Maicas & Mateo, 2020; Troilo *et al.*, 2021).



**Figura 3.** Proceso de elaboración del vino y subproductos generados en cada etapa (López-Astorga *et al.*, 2023).

Los raspones son las estructuras leñosas que sustentan las bayas de las uvas, eliminados al inicio del proceso de vinificación, concretamente durante el despalillado, para evitar que proporcionen astringencia al vino y afecten negativamente a las características de calidad organolépticas (Maicas & Mateo 2020, Silva *et al.*, 2023, Troilo *et al.*, 2021).

Las lías del vino son los residuos semisólidos depositados en el fondo de los depósitos tras el proceso de fermentación y almacenamiento, incluyendo los residuos generados tras el filtrado y centrifugado del vino. Su composición incluye principalmente levaduras y otras materias inorgánicas (Maicas & Mateo 2020, Troilo *et al.*, 2021).

El raspón o escobajo es la estructura leñosa que soporta el conjunto de granos que forman un racimo de uva y el bagazo de uva, compuesto principalmente por piel u hollejo, pulpa, residuos de semillas, es el residuo sólido resultante tras el prensado y el proceso de fermentación. El bagazo es considerado el principal subproducto de vinificación, representando el 20-25% del peso total de la uva destinada a la elaboración del vino (Maicas & Mateo 2020, Troilo *et al.*, 2021).

Los subproductos enológicos son matrices naturales caracterizadas por un alto contenido en nutrientes y sustancias que no son nutrientes, como son los compuestos fenólicos, que son un conjunto heterogéneo de moléculas o metabolitos secundarios que se encuentran de forma natural en las plantas y que presentan determinadas propiedades (antioxidantes, antimicrobianas, antialérgicas, antiinflamatorias, anticancerígenas y antivirales) con implicaciones beneficiosas en la salud humana (Silva *et al.*, 2023).

### **3.2. Compuestos fenólicos y su distribución en subproductos enológicos**

Los subproductos del vino y la uva son matrices naturales caracterizadas por un alto contenido de compuestos fenólicos o (poli)fenoles, responsables de algunas de las propiedades organolépticas más importantes tanto de las uvas como del vino, y desempeñan un papel importante en la calidad del vino tinto, influyendo en el color, sabor, amargor y astringencia (Silva *et al.*, 2023).

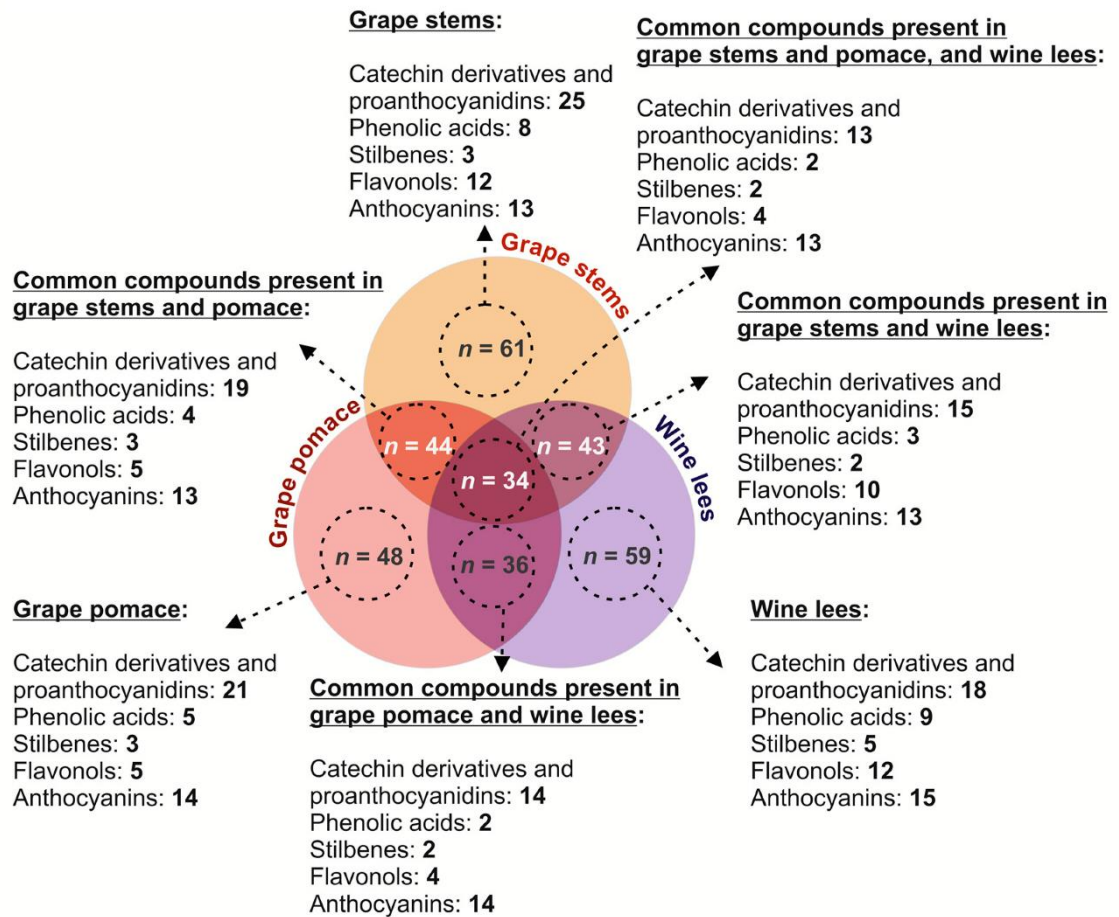


Asimismo, estos metabolitos secundarios también tienen propiedades bioactivas que pueden ser muy beneficiosas para la salud humana.

La composición fenólica de la uva y del vino y, *por ende*, de sus subproductos, depende de varios factores entre los que encontramos, la variedad y el estado de madurez de la uva, los factores edafoclimáticos, así como, las diferentes técnicas de vinificación en la industria (Silva *et al.*, 2023).

Los compuestos fenólicos son compuestos orgánicos cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido a un grupo hidroxilo. Basándonos en la naturaleza y estructura del esqueleto carbonado, los compuestos fenólicos se pueden clasificar en no flavonoides y flavonoides (C6-C3-C6) (Silva *et al.*, 2023).

En un estudio realizado recientemente por Costa-Pérez *et al.*, 2023, han observado que los perfiles (poli)fenólicos (cuali- y cuantitativo) de los subproductos (bagazo, raspón y lías) mostraron discrepancias significativas entre ellos, observándose una mayor diversidad de (poli)fenoles en los raspones de las uvas, seguido de cerca por las lías (Costa-Pérez *et al.*, 2023) (**Figura 4**). Además, de este estudio se puede destacar que los diferentes perfiles mostrados por los distintos subproductos de bodega pueden permitir prever su combinación para obtener una mezcla con una carga (poli)fenólica óptima y así aprovechar su aplicación como ingrediente tecnológico o suplemento dietético (Costa-Pérez, *et al.*, 2023).



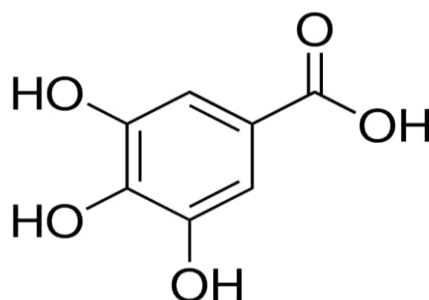
**Figura 4.** Representación esquemática de la diversidad de compuestos fenólicos identificados en raspón de uva, orujo de uva y lías de vino, extraída de (Costa-Pérez, *et al.*, 2023).

Los flavonoides (C6-C3-C6) componen el mayor grupo de compuestos fenólicos en subproductos de vinificación, siendo los más reconocidos en términos de bioactividad. Entre los flavonoides más destacados en estas matrices vegetales encontramos los antocianos (también denominados en ocasiones como "antocianinas"), con gran influencia en la definición del color y astringencia, y los flavonoles y flavanoles, con gran influencia en el carácter amargo y astringencia (Fang *et al.*, 2007).

Entre los compuestos no flavonoides presentes en subproductos vitivinícolas se incluyen derivados del ácido benzoico (C1-C6) y derivados del ácido hidroxicinámico (C3-C6), dos de los compuestos más representativos de esta familia, conocidos comúnmente como ácidos fenólicos (Silva *et al.*, 2023).

### 3.2.1. Ácido gálico

En este contexto, el ácido gálico (3,4,5-trihidroxi benzoico) (**Figura 5**) es uno de los ácidos fenólicos más abundantes en vino y en subproductos enológicos, y, por tanto, de gran interés para la industria agroalimentaria debido a sus múltiples actividades biológicas y tecnológicas (Bhuia *et al.*, 2023).



**Figura 5.** Estructura molecular del ácido gálico (3,4,5-trihidroxi benzoico).

El ácido gálico se forma en las plantas a través de la vía del ácido shikímico. No obstante, el mecanismo exacto de su biosíntesis no es del todo conocido. Por esta razón, se han propuesto tres rutas alternativas para su producción (1)  $\alpha$ -oxidación del ácido 3,4,5-trihidroxicinámico (2) hidroxilación del ácido protocatéquico y (3) deshidratación directa de ácido 3-deshidroshikímico (Bontpart *et al.*, 2016; Fernandes & Salgado, 2016; Wianowska & Olszowy-Tomczyk, 2023).

El ácido gálico es una molécula conocida por su alta actividad antioxidante y su capacidad para proteger contra el estrés oxidativo. El estrés oxidativo se origina cuando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés 'Reactive Oxygen Species') sobrepasa la capacidad del cuerpo para neutralizarlas (Viada Pupo *et al.*, 2017). La capacidad antioxidante del ácido gálico viene determinada fundamentalmente por los grupos hidroxilo que presenta en la estructura del anillo, permitiéndole neutralizar radicales libres y actuar como quelantes de metales que catalizan reacciones de formación de ROS. Además, actúa aumentando la actividad de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa) así como de antioxidantes no enzimáticos (glutatión, vitamina C o ácido ascórbico y vitamina E o tocoferol) (Wianowska & Olszowy-Tomczyk, 2023).

El estrés oxidativo daña al ácido desoxirribonucleico (ADN) y contribuye a la carcinogénesis (Viada Pupo *et al.*, 2017). En este contexto, la capacidad antioxidante del ácido gálico puede actuar protegiendo al ADN contra la oxidación, exhibiendo actividad antitumoral. Asimismo, se han propuesto varios mecanismos que contribuyen a la actividad antitumoral del ácido gálico como es la capacidad de inducir la apoptosis celular, regular la supresión y promoción de oncogenes e inhibir tanto la proliferación celular como las metaloproteinasas de la matriz, enzimas que sobreexpresadas pueden promover la invasión de células tumorales y la formación de metástasis (Wianowska & Olszowy-Tomczyk, 2023).

Por otro lado, el ácido gálico también exhibe propiedades antiinflamatorias, interactuando e inhibiendo la vía de señalización proinflamatoria NF-Kb, reduciendo la expresión y actividad de las enzimas óxido nítrico sintasa (iNOS), mieloperoxidasa (MPO), ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF- $\alpha$ ). De este modo, el ácido gálico muestra un papel inmunomodulador, pudiendo actuar como compuesto coadyuvante en tratamientos de determinadas enfermedades gastrointestinales, cardiovasculares y/o neurodegenerativas (Bhuia *et al.*, 2023; Wianowska & Olszowy-Tomczyk, 2023).

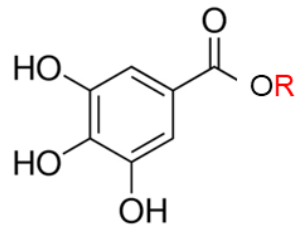
Se ha demostrado que el ácido gálico tiene actividad antimicrobiana contra diferentes bacterias, incluyendo algunas cepas patógenas como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y especies de *Salmonella* spp. Actualmente, este compuesto es de gran interés tanto en la industria alimentaria como farmacéutica, utilizándose para la síntesis de nanopartículas de plata recubiertas con ácido gálico cuyo objetivo es adherirse y destruir a determinados microorganismos (Wianowska & Olszowy-Tomczyk, 2023).

### 3.2.2. Derivados esterificados de ácido gálico: Galatos de alquilo

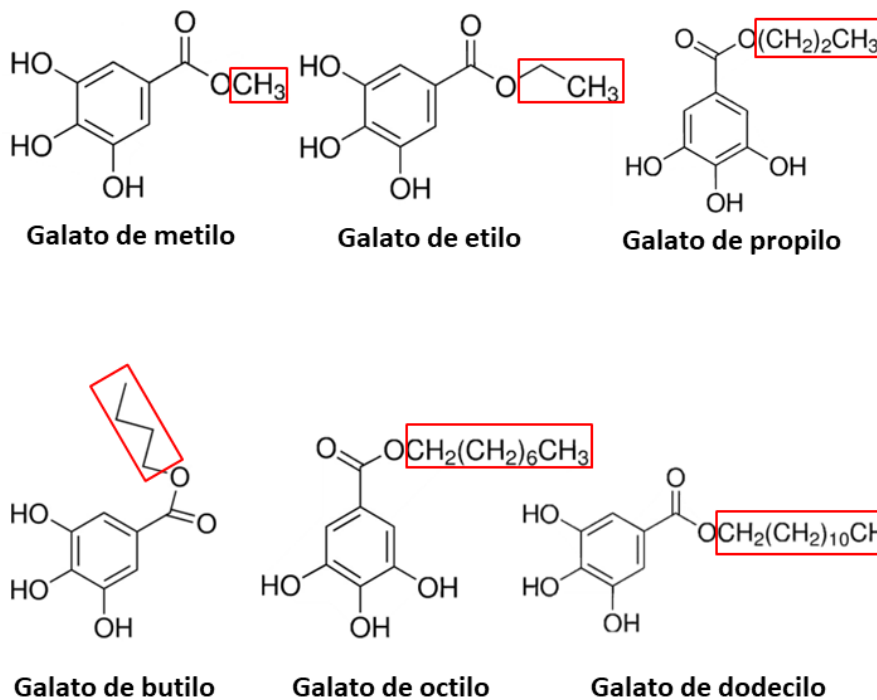
Debido a la limitada solubilidad del ácido gálico en medios lipídicos por tratarse de una molécula polar y, determinada por los grupos hidroxilo y carboxílico, recientemente se está investigando en profundidad el aislamiento y la síntesis química de compuestos que mantengan la bioactividad intrínseca del compuesto fenólico nativo pero que presenten un mayor carácter lipofílico, contribuyendo favorablemente a la bioactividad, al aumentar la afinidad y

permeabilidad por las membranas celulares (Zhao *et al.*, 2021). De modo que, pueden atravesar más fácilmente las bicapas lipídicas mejorando su biodisponibilidad y así ejercer su actividad biológica en tejidos u órganos diana. En este contexto, la incorporación de un acilo de longitud variable (C1-C12) en la cadena lateral del ácido fenólico, permite generar moléculas más lipofílicas sin que esta incorporación afecte a la actividad biológica propia del grupo fenol. La naturaleza química de estas moléculas ha permitido identificar una nueva categoría de compuestos potencialmente bioactivos denominada lipofenoles (o fenolípidos) (Crauste *et al.*, 2016).

A este respecto, los galatos de alquilo, derivados esterificados del ácido gálico o también conocidos como galoil ester, son un grupo de fenolípidos que han sido identificados en alimentos de origen vegetal, en determinadas frutas (arazá, uva) y también en vino y en vinagre (Monagas *et al.*, 2005). Tal y como observamos en la **Figura 6**, los galatos de alquilo se diferencian entre sí por la longitud de su cadena alquílica, la cual le atribuye múltiples propiedades bioactivas como actividad antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena y antiviral (Zhao *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022).



RADICAL	COMPUESTO
CH <sub>3</sub>	Galato de metilo
CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	Galato de etilo
(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Galato de propilo
CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Galato de butilo
CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	Galato de octilo
CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> CH <sub>3</sub>	Galato de dodecilo

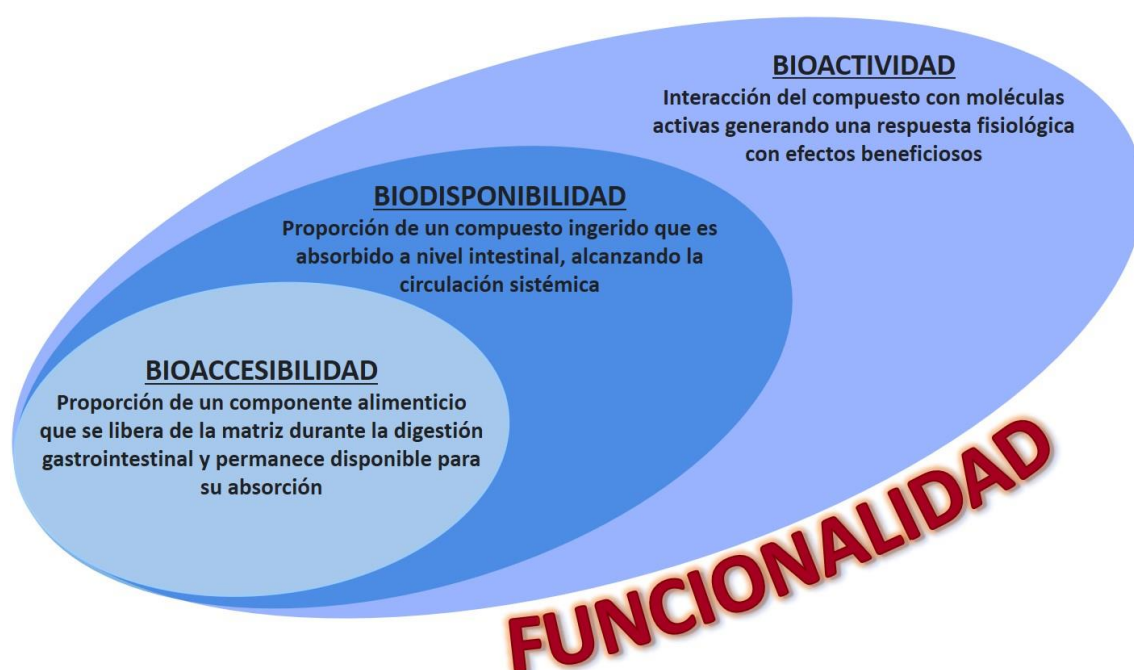


**Figura 6.** Ésteres alquílicos del ácido gálico.

### 3.2.3. Funcionalidad de compuestos fenólicos y sus derivados

Desde hace años, los galatos de alquilo han sido utilizados como aditivos alimentarios antioxidantes no tóxicos en productos alimenticios, principalmente aquellos de naturaleza oleaginosa. De hecho, el galato de propilo (E-310), es sintetizado industrialmente para su uso habitual como aditivo alimentario, evaluado y aprobado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (Aguilar *et al.*, 2014).

Sin embargo, dada la limitada información disponible sobre los mecanismos de digestión y absorción *in vivo* de los derivados esterificados de ácido gálico, la aplicación práctica de dichos ésteres alquílicos como ingredientes funcionales en alimentos es limitada y debería ser investigada (Wang *et al.*, 2022). No obstante, hay que tener en cuenta, que el concepto de funcionalidad engloba tanto la bioaccesibilidad o la proporción de un componente alimentario que se libera de la matriz alimentaria por acción de las enzimas digestivas durante la digestión gastrointestinal y permanece disponible para ser absorbido. Por tanto, la absorción intestinal junto con las reacciones de biotransformación define la biodisponibilidad del compuesto como la proporción del mismo que es ingerido, absorbido y es capaz de alcanzar la circulación sistémica. Ambos factores están ligados a la concentración final del compuesto en las células y/o tejidos y, por tanto, a la bioactividad o respuesta fisiológica beneficiosa que presente dicho compuesto (Agulló, *et al.*, 2022). Por tanto, la funcionalidad de los alimentos es fuertemente dependiente de la propia naturaleza química de sus compuestos, su bioaccesibilidad, su biodisponibilidad y bioactividad, lo que hace que dichos factores deban considerarse como un todo (**Figura 7**) (Guerra *et al.*, 2012; Gutiérrez-Grijalva *et al.*, 2016).



**Figura 7.** Funcionalidad (bioaccesibilidad, biodisponibilidad y bioactividad) de los compuestos presentes en los alimentos.

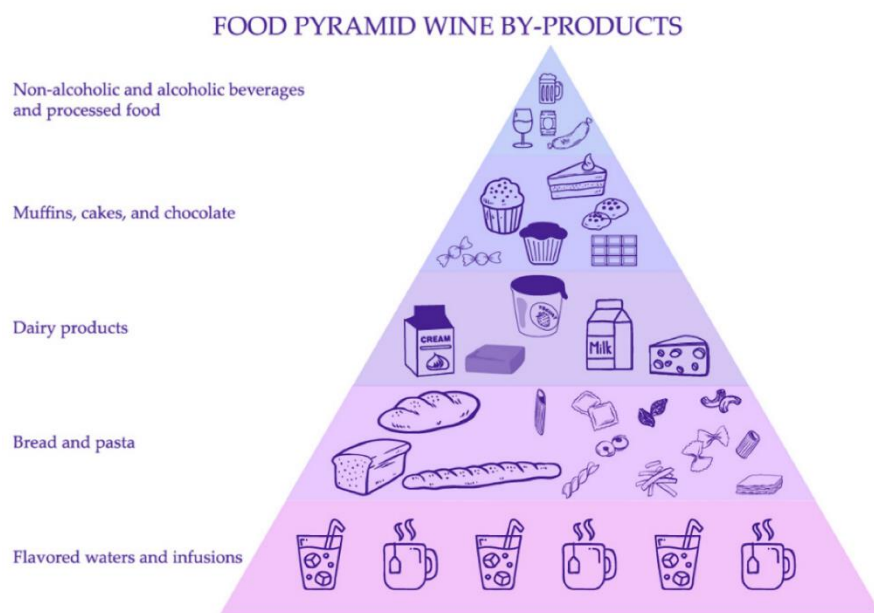
Actualmente, solo existen evidencias científicas llevadas a cabo en los últimos años en modelos de simulación *in vitro* gastrointestinal que aportan información muy útil sobre la estabilidad, bioaccesibilidad y biodisponibilidad de galatos de alquilo sintetizados químicamente, observándose que el grado de hidrólisis, por acción de las lipasas intestinales, está correlacionado negativamente con la longitud de la cadena alquílica (Wang *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022). Asimismo, se ha demostrado que los galatos de alquilo pueden alcanzar el ciego y el colon, y ser metabolizados por la microbiota intestinal para producir ácido gálico libre, pudiendo influir en la liberación sostenida del ácido fenólico, manteniendo su actividad biológica en el cuerpo durante un tiempo más prolongado con los consecuentes beneficios para la salud, dada la vida media corta que presenta el ácido gálico en el cuerpo humano (Wang *et al.*, 2022). En la actualidad, no existen evidencias científicas sobre el mecanismo de absorción digestiva de los galatos de alquilo presentes en matrices alimentarias, por lo tanto, futuras investigaciones son necesarias para contribuir al avance del conocimiento sobre el metabolismo de dichos compuestos presentes en los alimentos y subproductos y sus mecanismos de absorción intestinal.

### **3.3. Aplicaciones para la industria alimentaria**

Actualmente, la necesidad de sostenibilidad en la industria vinícola ha focalizado su interés en la gestión de los subproductos del vino, adoptando acciones de aprovechamiento integral, que permitan utilizarlos como una interesante fuente de compuestos 'biofuncionales' y ser empleados en diversas aplicaciones de la industria alimentaria, cosmética y/o farmacéutica con el consecuente beneficio económico, medioambiental y social (Ferrer Gallego & Silva, 2022).

La pirámide alimentaria de la dieta mediterránea basada en la valorización de subproductos del vino (**Figura 8**), está constituida por cinco grupos de alimentos y bebidas entre los que encontramos, en orden creciente, aguas e infusiones aromatizadas, pan y pasta, lácteos, productos de pastelería, bebidas (alcohólicas y no alcohólicas) y alimentos procesados (Ferrer Gallego & Silva, 2022).





**Figura 8.** Aplicación de los subproductos del vino en la industria alimentaria (Ferrer-Gallego & Silva, 2022).

Recientemente, se ha descrito que los subproductos enológicos tienen gran utilidad en la elaboración de bebidas funcionales. Los compuestos volátiles derivados de estos residuos presentan sabores y colores que se utilizan para mejorar el perfil aromático de aguas saborizantes, té de frutas e infusiones, por lo tanto, además de mejorar las características organolépticas aportan valor funcional añadido debido a sus propiedades antioxidantes (Ferrer-Gallego & Silva, 2022).

Respecto a alimentos del grupo de los granos, el polvo de bagazo de uva es eficiente como aditivo alimentario para enriquecer la harina en la elaboración de pasta y pan de trigo (Tolve *et al.*, 2021; Carpentieri *et al.*, 2022). Estudios recientes han demostrado que mejora las propiedades reológicas y microestructurales de la masa del trigo (Lou *et al.*, 2021), así como la textura de la pasta después de la cocción, el perfil nutricional y el contenido en fibra (Balli *et al.*, 2021).

Asimismo, los subproductos enológicos actúan como una relevante fuente de compuestos funcionales para la formación de productos lácteos, como leches fermentadas, yogures, quesos o helados (Ferrer-Gallego & Silva, 2022). No

mejoran únicamente su funcionalidad, sino también sus características organolépticas incluyendo, la textura, cremosidad, color y aroma (Pavlou *et al.*, 2021). Además, se ha descrito que el enriquecimiento con bagazo de uva puede aumentar el tiempo de almacenamiento de los productos lácteos, alargando su vida útil (Tseng & Zhao, 2013). Otros estudios recientes han demostrado que los extractos de bagazo de uva pueden actuar como coagulante en la producción de tofu (Zeppa *et al.*, 2021), y también reducir el contenido de grasa del queso y aumentar los niveles de proteína (Gaglio *et al.*, 2021).

Los productos azucarados también son objeto de estudio para la incorporación de subproductos de vino. En chocolate, el uso de bagazo de uva como aditivo actúa mejorando sus propiedades reológicas y de digestibilidad (Bolenz & Glöde & 2021). Además, se ha considerado como un ingrediente novedoso para mejorar las propiedades nutritivas y saludables en productos sin gluten (Baldán *et al.*, 2021).

Actualmente, se está investigando el efecto de los extractos de subproductos de vinificación sobre la estabilidad oxidativa, los compuestos orgánicos volátiles y el perfil aromático en bebidas (con y sin alcohol) y en alimentos procesados. En lo que respecta a las bebidas alcohólicas en las industrias cervecera y vinícola se aplican como agente clarificante (Ferrer-Gallego & Silva, 2022; Wianowska & Olszowy-Tomczyk, 2023)

Es bien sabido que los subproductos de la industria del vino, debido a su alto contenido en compuestos fenólicos, tienen influencia en el aumento de la vida útil de los alimentos (Ferrer-Gallego & Silva, 2022). Se ha demostrado que los extractos de bagazo de uva previenen la lipooxidación en productos derivados de pescado e inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, lo que conlleva a una mejora de la calidad del producto (Pazos *et al.*, 2005). Además de prevenir la oxidación lipídica y el crecimiento microbiano, los subproductos de la vinificación también inhiben la formación de compuestos perjudiciales para la salud al actuar como quelantes, observándose recientemente que los extractos de piel y de semilla de uva inhiben la formación de acrilamida durante la fritura de patatas (Xu *et al.*, 2015) y la formación de N-nitrosodimetilamina en productos cárnicos (Wang *et al.*, 2015).

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. Extracción y análisis de galatos de alquilo en matrices alimentarias de origen vegetal

#### 4.1.1. Sustancias químicas y reactivos

Los estándares del ácido gálico y sus derivados esterificados con diferentes longitudes de cadena de alquilo de C1 a C12 correspondientes a galatos de metilo, etilo, propilo, butilo, octilo y dodecilo se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). Los solventes cromatográficos de calidad analítica (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, LC-MS del inglés '*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*') como H<sub>2</sub>O y acetonitrilo (ACN) se obtuvieron de JT Baker (Phillipsburg, Nueva Jersey, EE.UU.). Los galatos de alquilo se disolvieron en etanol adquirido a Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.) para preparar las disoluciones madre a concentraciones micromolar (µM), para posteriormente realizar diluciones sucesivas en metanol/H<sub>2</sub>O Milli-Q (50:50, v/v). Todas las soluciones madre de ácido gálico y sus derivados lipofenólicos se almacenaron a -80 °C para evitar su degradación.

#### 4.1.2. Matrices de origen vegetal

Para llevar a cabo el trabajo experimental se seleccionaron tres matrices vegetales ricas en ácido gálico (raspón y bagazo de uvas y lías de vino) (*Vitis vinifera* L. var. 'Monastrell'). Estos subproductos fueron suministrados por la bodega Viña Elena, ubicada en Jumilla, Murcia, una reconocida Denominación de Origen Protegida (DOP) vinícola del sureste de España (**Figura 9**).



**Figura 9.** Subproductos enológicos usados para el desarrollo del Trabajo Fin de Máster.

#### 4.1.3. Extracción de galatos de alquilo en subproductos vitivinícolas

Los referidos subproductos de bodega (raspón, bagazo y lías) fueron procesados mediante liofilización (CHRIST concentrador 2-4D, Wolfslabs, York, UK). El período entre el muestreo y el procesamiento fue menor a 4 h para evitar la alteración del perfil fitoquímico. Todos los subproductos enológicos liofilizados se prepararon siguiendo el procedimiento descrito por Milinčić *et al.*, 2021 con ligeras modificaciones. Las muestras se homogeneizaron en etanol y se procesaron por ultrasonidos a 40 kHz durante 1 hora (sonicador Branson 3510MT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Posteriormente, se centrifugaron a 10000 rpm, durante 5 min, a 4 °C, se filtraron a través de un filtro de membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) de 0.22 µm (Millipore, MA, EE. UU.).

#### 4.2. Análisis de la bioaccesibilidad de galatos de alquilo mediante un modelo estático de digestión *in vitro*

##### 4.2.1. Sustancias químicas y reactivos

Para llevar a cabo las simulaciones de los fluidos digestivos gástrico e intestinal se utilizaron los siguientes reactivos: KCl (0.50 M) (Ref. # 131494.1211, Panreac), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.50 M) (Ref. # 131509.1211, Panreac), NaHCO<sub>3</sub> (1.00 M) (Ref. # 131638.1210, Panreac), NaCl (2.00 M) (Ref. # S7653-1KG, Sigma-Aldrich), MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub> (0.15 M) (Ref. # 63064-500G, Fluka) y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.20 M) (Ref. # A6141-500G, Sigma-Aldrich). Para ajustar el pH de las disoluciones digestivas se utilizó HCl (1.00 M) (7647-01-0, Fisher Scientific) y NaOH (0.20 M) (Ref. # S8045-500G, Sigma-Aldrich). Además, se utilizaron diferentes enzimas digestivas derivadas de páncreas porcino para llevar a cabo la simulación gástrica (enzima pepsina (Ref. # P6887-1G, Sigma-Aldrich)) y la intestinal (enzima pancreatina (Ref. # P7545-25G 8 x USP, Sigma-Aldrich)).

##### 4.2.2. Procedimiento de simulación *in vitro* de digestión gastrointestinal de subproductos vitivinícolas

Para evaluar la bioaccesibilidad de los galatos de alquilo en los diferentes subproductos liofilizados y molidos (raspón, bagazo y lías) (**Figura 10**), se pesaron 500 mg de e cada matriz vegetal (n=18), destinadas a muestras para la

simulación de la fase gástrica (n=6), intestinal (n=6) y gastrointestinal (n=6). La simulación de la digestión gastrointestinal estática *in vitro* se realizó siguiendo la metodología consensuada internacionalmente (INFOGEST 2.0), de acuerdo al método previamente desarrollado y validado por Minekus, *et al.*, 2014 y por Brodkorb, *et al.*, 2019.



**Figura 10.** Subproductos enológicos liofilizados usados para la evaluación de la bioaccesibilidad tras la simulación *in vitro* de la digestión gastrointestinal.

#### 4.2.3. Simulación de fluido gástrico

El volumen y la concentración de los reactivos químicos utilizados para preparar el fluido gástrico se encuentran especificados en la **Tabla 1**. El enzima pepsina ( $\geq 3200$  U/mg proteína) se añadió a una concentración final en el fluido gástrico de 2000 U/mL, siguiendo el protocolo estandarizado descrito en la metodología previamente validada (Minekus, *et al.*, 2014; Brodkorb, *et al.*, 2019). Para ajustar el pH a 3 se añadió HCl 1M.

**Tabla 1.** Volumen y concentración de reactivos para la preparación de 500 mL de fluido gástrico simulado.

Preparación de 500 mL de fluido gástrico		
Reactivos (M)	Fluido gástrico simulado - pH 3	
	Volumen (mL) de las disoluciones madre para 500 mL del fluido gástrico	Concentración final en el fluido (mmol/L)
KCl (0.50 M)	6.90	6.90
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.50 M)	0.90	0.90
NaHCO <sub>3</sub> (1.00 M)	12.50	25.00
NaCl (2.00 M)	11.80	47.20
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> (0.15 M)	0.40	0.10
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0.50 M)	0.50	0.50
Para el ajuste de pH		
NaOH (0.2 M)	-	-
HCl (0.1 M)	Ajuste a pH 3	

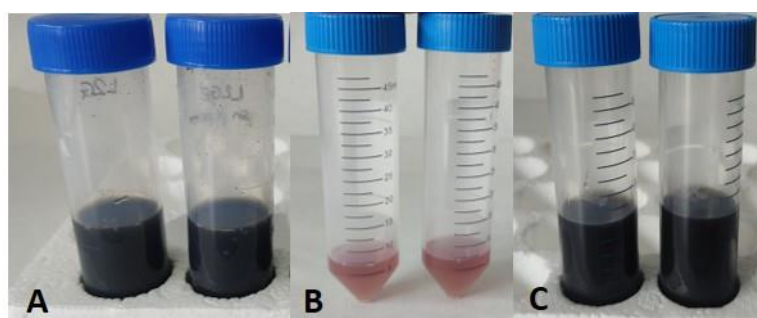
#### 4.2.4. Simulación de fluido intestinal

Los volúmenes y concentraciones necesarios para la preparación del fluido intestinal simulado se llevaron a cabo de acuerdo con las indicaciones detalladas en la **Tabla 2**. El enzima pancreatina porcina (con actividades amilasa, lipasa y proteasa) se agregó a una concentración de 100 U/mL. El pH del fluido intestinal se ajustó a 8 adicionando NaOH.

**Tabla 2.** Volumen y concentración de reactivos para la preparación de 500 mL de fluido intestinal simulado.

Preparación de 500 mL de fluido intestinal		
Reactivos (M)	Fluido intestinal simulado - pH 8	
	Volumen (mL) de las disoluciones madre para 500 mL del fluido intestinal	Concentración final en el fluido (mmol/L)
KCl (0.50 M)	6.80	6.80
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.50 M)	0.80	0.80
NaHCO <sub>3</sub> (1.00 M)	42.50	85.00
NaCl ( 2.00 M)	9.60	38.40
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> (0.15 M)	1.10	0.33
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0.50 M)	-	-
Para el ajuste de pH		
NaOH (0.20 M)	-	-
HCl (0.1 M)	Ajuste a pH 8	

Para llevar a cabo la simulación gástrica, intestinal y gastrointestinal de los subproductos vitivinícolas se partió de 500 mg pesados de cada subproducto, como se mencionó previamente, a los cuales se les agregó el fluido simulado correspondiente a cada fase como se detalla en el apartado anterior. Posteriormente, las muestras se incubaron a 37 °C en un baño térmico con agitación (52 U/min) para simular los movimientos peristálticos durante 2 h en la simulación de las fases independientes (gástrica e intestinal) y 4h para las muestras de simulación gastrointestinal (**Figura 11**).



**Figura 11.** Fracción bioaccesible obtenida tras la simulación estática *in vitro* de digestión gástrica (A), intestinal (B) y gastrointestinal (C) de lías de vino.

A continuación, las muestras resultantes de las tres simulaciones digestivas se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante generado correspondiente a la fase bioaccesible se filtró a través de un filtro de membrana de PVDF de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore, MA, EE. UU.) para su análisis posterior por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con tecnología de triple cuadrupolo (UHPLC-QqQ-MS/MS).

#### 4.2.5. Análisis de galatos de alquilo por UHPLC-QqQ-MS/MS

Para la separación de los metabolitos presentes en las muestras procesadas de raspón, bagazo y lías se utilizó la técnica de cromatografía líquida de ultra-ultra presión (UHPLC, del inglés '*Ultra High Performance Liquid Chromatography*'). Los metabolitos se ionizaron mediante la técnica de electrospray (ESI, del inglés, '*Electrospray Ionization*') en modo negativo, y se detectaron a través de espectrometría de masas en tándem con tecnología de triple cuadrupolo (UHPLC-QqQ-MS/MS) Modelo 6460 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania), técnica instrumental que permite identificar las moléculas

libres y esterificadas presentes en las muestras analizadas al estudiar las características de fragmentación específicas. Para la separación cromatográfica de dichas moléculas, se utilizó la columna cromatográfica ACQUITY BEH C18 (2.1 × 50 mm, 1.7 μm) (Waters, Cerdanyola del Vallés, España), a una temperatura de 30 °C. La fase móvil A consistió en 0.1% de ácido fórmico en H<sub>2</sub>O y con ACN como fase móvil B. El volumen de flujo se estableció en 0.30 mL/min y el volumen de inyección se fijó en 15 μL. Para obtener el perfil cualitativo y cuantitativo, los galatos de alquilo se identificaron mediante el método de Monitorización de Reacciones Múltiple (MRM, del inglés, '*Multiple Reaction Monitoring*'), donde se asignaron dos transiciones principales (cuantificación y confirmación) para la correcta identificación de los analitos correspondientes (**Tabla 3**). La adquisición y el análisis de datos se realizaron utilizando el software MassHunter versión B.08.00 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania).

**Tabla 3.** Peso molecular y principales transiciones de cuantificación y confirmación de ácido gálico y sus derivados esterificados analizados en modo de ionización negativo.

Analito	Peso molecular (g/mol)	MRM cuantificación	MRM confirmación
Ácido gálico	170.12	169>125	169>79
Galato de metilo (C1)	184.04	183>124	183>169
Galato de etilo (C2)	198.17	197>124	197>169
Galato de propilo (C3)	212.20	211>124	211>169
Galato de butilo (C4)	226.23	225>124	225>169
Galato de octilo (C8)	282.33	281>124	281>169
Galato de dodecilo (C12)	338.44	337>124	337>169

#### 4.2.6. Análisis estadístico

Para analizar las diferencias en el perfil cuantitativo de los compuestos fenólicos de interés en las tres matrices vegetales (raspón, bagazo y lías) y tras la simulación *in vitro* de digestión gastrointestinal, se empleó el software SPSS 25.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). En primer lugar, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para conocer si la media de al menos un

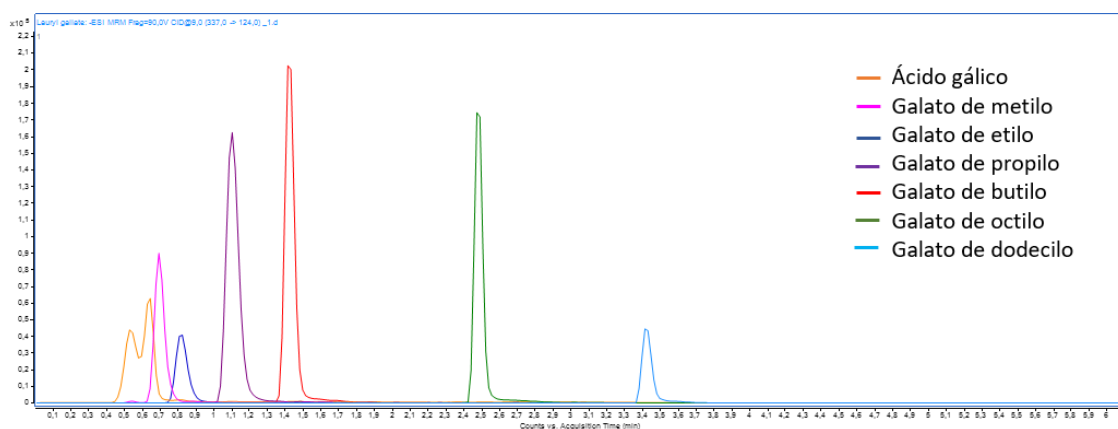


tratamiento es diferente de los otros tratamientos y la prueba o test de comparación múltiple de Tukey para saber exactamente cuáles son los tratamientos que muestran diferencias significativas entre sí (valor  $p < 0.05$ ). Los datos cuantitativos se presentan como la media  $\pm$  la desviación estándar (DE). También se realizó un análisis de componentes principales (ACP). El ACP es un método estadístico propuesto por Pearson (1901) e independientemente también por Hotelling (1933), que consiste en describir la variación producida por la observación de  $p$  variables aleatorias en términos de un conjunto de nuevas variables no correlacionadas entre sí (denominadas componentes principales). Estas nuevas variables se obtienen por orden de importancia, de forma que el primer componente principal (CP1) incorpora la mayor cantidad posible de variación debida a las variables originales; el segundo componente principal (CP2) se elige de forma que explique la mayor cantidad posible de variación que queda sin explicar por el PC1, sujeto a la condición de no estar correlacionado con el PC1, y así sucesivamente. El ACP concreto para este estudio fue realizado teniendo en cuenta los tres tipos de material vegetal evaluados y como se ven afectados por los distintos metabolitos de interés también estudiados. A continuación, se realizó un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales, para asignar los componentes principales (CPs) que presentaban valores superiores o iguales a 1.5, lo que permitió identificar dos componentes principales (CP1 y CP2) que juntos explicaban un 73.78% de la variación total del experimento dentro del conjunto de datos analizados. También se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para conocer si las media de al menos un material vegetal es diferente de los otros tratamientos y la prueba o test de comparación múltiple de Tukey para saber exactamente cuáles son los materiales que muestran diferencias significativas entre sí (valor  $p < 0.05$ ). El ACP se realizó utilizando el software StatGraphics Centurion XV de StatPoint Technologies (Warrenton, VA, EE.UU.).



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis del perfil cualitativo de ácido gálico y sus derivados esterificados por UHPLC-QqQ-MS/MS, representado en la Figura 12, muestra la separación de la molécula de ácido gálico libre y esterificada con los diferentes alcoholes (metanol, etanol, propanol, butanol, octanol y dodecanol), dónde se puede observar la abundancia (cps) de cada compuesto junto con sus respectivos tiempos de retención (**Figura 12**).

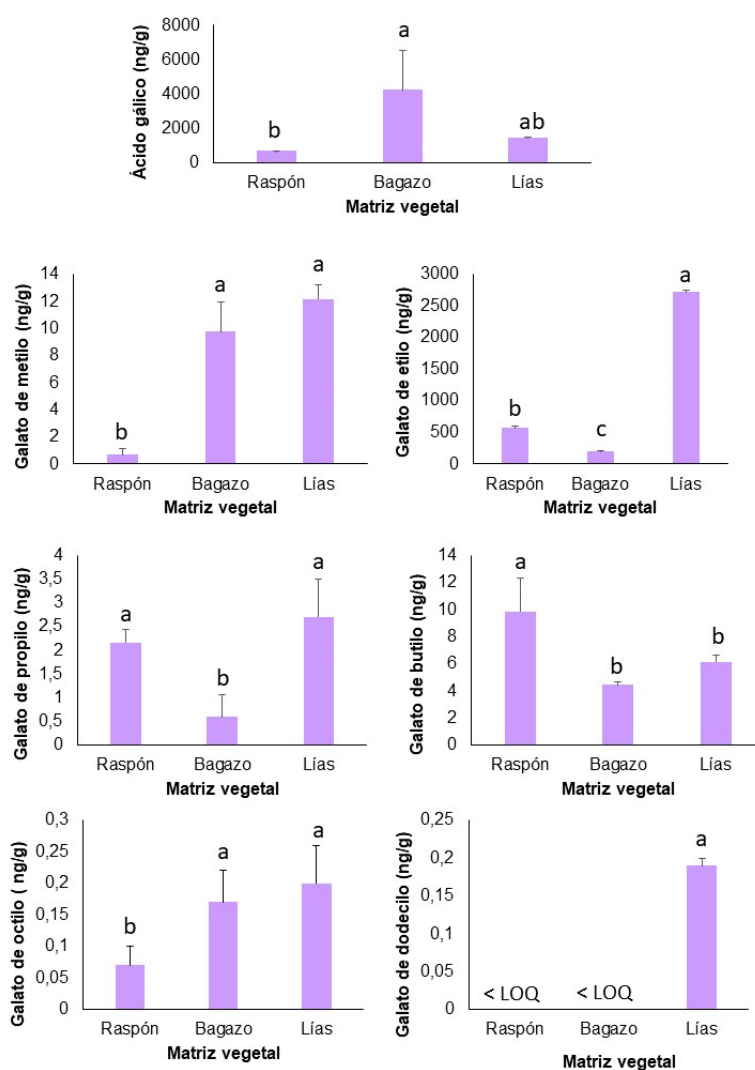


**Figura 12.** Cromatograma UHPLC-QqQ-MS/MS correspondiente a estándares de ácido gálico y sus derivados esterificados (galato de metilo, galato de etilo, galato de propilo, galato de butilo, galato de octilo y galato de dodecilo).

El ácido gálico muestra un tiempo de retención de 0.52, lo que indica que es el primer compuesto en el orden de elución por su naturaleza más polar, teniendo en cuenta las fases móviles y el gradiente del método cromatográfico utilizado (ver sección Material y métodos). A medida que se avanza en el tiempo de retención, se aprecia la separación de los derivados esterificados del ácido gálico, con mayor lipofilia. Así, galato de metilo (C1) presenta un tiempo de retención de 0.67, seguido de galato de etilo (C2) con 0.79, galato de propilo (C3) con 1.07, galato de butilo (C4) con 1.42, galato de octilo (C8) con 2.46 y finalmente galato de dodecilo (C12) con 3.42, observando que el tiempo de elución del derivado esterificado está correlacionado con la longitud de la cadena alquílica del alcohol y, por tanto, con su mayor carácter lipofílico, de acuerdo a la metodología cromatográfica utilizada.

## 5.1. Contenido en ácido gálico y ésteres alquílicos en los diferentes subproductos enológicos analizados.

Mediante el análisis de perfil cuantitativo (ng/g) por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con tecnología de triple cuadrupolo de moléculas de ácido gálico libres y esterificadas con alcoholes con diferentes longitudes de cadena alquílica, observamos que los compuestos más abundantes en los subproductos de vinificación estudiados (raspón, bagazo y lías) fueron el ácido gálico y su derivado esterificado con etanol (galato de etilo), cuyas concentraciones superan en tres órdenes de magnitud al resto de compuestos esterificados (**Figura 13**).



**Figura 13.** Contenido en ácido gálico y ésteres alquílicos (ng/g) en los diferentes subproductos enológicos analizados.

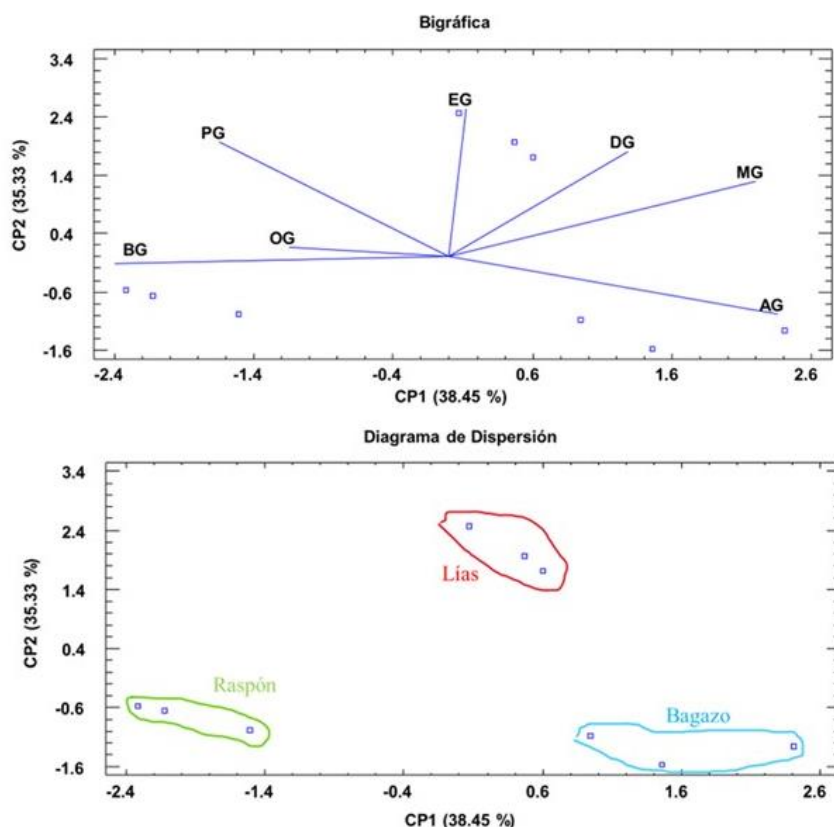
El bagazo se mostró como el subproducto con mayor cantidad en ácido gálico, superando los 4600 ng/g, al contrario que en el raspón, cuya concentración no superó los 750 ng/g. Por otro lado, las lías no mostraron diferencias significativas, en concentración de ácido gálico, con los subproductos mencionados anteriormente, mostrando una concentración en torno a 1400 ng/g. La concentración de galato de metilo (ng/g) mostró una tendencia creciente durante el proceso de vinificación observándose diferencias significativas entre el raspón, dónde la concentración es muy reducida (0.70 ng/g), con las lías y bagazo, dónde la concentración fue considerablemente superior (~10 ng/g), no encontrándose diferencias estadísticas entre estos dos subproductos. Respecto al contenido en galato de etilo, se observan diferencias significativas en todos los subproductos, siendo la concentración en lías un orden de magnitud superior al contenido en raspón (569.31 ng/g) y en bagazo (205.91 ng/g). En relación a la concentración de galato de propilo, el bagazo obtuvo la menor concentración (ng/g) con una media de 0.60 ng/g, oscilando en el resto de los subproductos entre 2.00 y 2.80 ng/g, no mostrando diferencias significativas entre sí. Por el contrario, la concentración de galato de butilo (ng/g) mostró una tendencia a la baja, observándose mayor concentración en los raspones (~10.0 ng/g) con respecto a las lías y bagazo, con 4.44 ng/g y 6.15 ng/g, respectivamente, sin diferencias significativas entre las lías y el bagazo. Por otro lado, todos los extractos presentaron una disminución brusca en la producción de los ésteres de octilo y dodecilo. En cuanto al contenido en galato esterificado con octanol, se observa una tendencia creciente durante el proceso de vinificación observándose diferencias significativas entre el raspón, dónde la concentración es muy reducida (0.07 ng/g) con las lías y bagazo, dónde la concentración fue considerablemente superior (~17 ng/g). Respecto a galato de dodecilo, la abundancia del compuesto fue muy baja en las lías (0.20 ng/g), mientras que, en los subproductos restantes (raspón y bagazo) estuvieron por debajo del límite de cuantificación (LOQ, del inglés '*limit of quantification*') (**Figura 13**).

El análisis de componentes principales (APC) es una técnica estadística utilizada para reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos. Al realizar un ACP, se obtienen una serie de componentes principales que representan una combinación lineal de las variables originales. Estos componentes principales

tienen varias ventajas como: 1) La reducción de dimensionalidad donde el ACP permite reducir la cantidad de variables originales a un conjunto más pequeño de componentes principales. Esto simplifica el análisis y la interpretación de los datos al trabajar con un espacio de menor dimensión; 2) Identificación de patrones que se consiguen al combinar las variables originales en componentes principales, el ACP puede revelar patrones ocultos o relaciones subyacentes en los datos. Esto puede ayudar a comprender la estructura y la variabilidad de los datos, así como identificar grupos o clústeres similares; 3) Eliminación de multicolinealidad que ocurre cuando las variables originales están altamente correlacionadas entre sí. Al combinar estas variables en componentes principales no correlacionados, se elimina la multicolinealidad, lo que facilita un análisis más preciso y robusto; 4) Selección de características donde el ACP puede ayudar a identificar las variables más relevantes o informativas en un conjunto de datos. Al examinar la contribución de cada variable a los componentes principales, es posible identificar aquellas que aportan más información y descartar las que tienen una contribución mínima; 5) Visualización de datos ya que el ACP facilita la visualización de los mismos en gráficos de menor dimensión, como gráficos de dispersión o gráficos biplot. Esto permite una representación visual más clara de los patrones y relaciones en los datos; 6) Compresión de datos ya que el ACP también se utiliza como una técnica de compresión de datos, donde se puede representar un conjunto de datos completo utilizando solo los componentes principales más relevantes. Esto puede ser útil en situaciones donde el almacenamiento o la transmisión de grandes conjuntos de datos es costoso o limitado.

Los resultados obtenidos en el ACP permiten establecer la relación entre los tres materiales vegetales (bagazo, raspón y lías) estudiados y los siete analitos analizados que son el ácido gálico (AG) y sus derivados esterificados galato de metilo (C1, MG), galato de etilo (C2, EG), galato de propilo (C3, PG), galato de butilo (C4, BG), galato de octilo (C8, OG) y galato de dodecilo (C12, DG). Concretamente esta relación ha permitido extraer dos componentes principales (CPs) que han mostrado unos eigenvalores superiores a 1.5. Concretamente la CP1 explica el 38.45% de la variabilidad del experimento o porcentaje de varianza y la CP2 explica el 35.33% de la variabilidad del

experimento. Por tanto, el porcentaje acumulado de ambas componentes explica casi un 75% de la variabilidad total, lo que es un valor considerablemente alto. En la bíglica (biplot), además se puede apreciar que para la CP1 las variables (analitos) con mayor peso son el ácido gálico (AG) y los derivados esterificados de un carbono (MG) y los de cuatro carbonos (BG). Con respecto a la CP2 destacan los derivados esterificados de dos carbonos (EG), de tres carbonos (PG) y de doce carbonos (DG). En el diagrama de dispersión podemos ver como quedan agrupados los materiales vegetales estudiados, en función de los diferentes compuestos analizados. Para la CP1 se observa una clara separación de las tres matrices ( $F=36.90$  y  $\text{valor-P} = 0.004^{***}$ ) quedando el raspón en la parte extrema de la izquierda y abajo dado su mayor contenido en los derivados esterificados con 4 carbonos (BG) con respecto a las restantes matrices analizadas. Y en el caso del bagazo, queda localizado en la parte extrema de la derecha abajo debido a la cantidad ácido gálico (AG) y del derivado esterificado de un carbono (MG) en comparación con el raspón y las lías. De la misma manera, para la CP2 se observa una clara separación entre las lías y los otros dos materiales, el raspón y el bagazo ( $F=109.86$  y  $\text{valor-P}=0.000^{***}$ ). La separación de las lías se debe a los derivados esterificados de dos carbonos (EG) y de doce carbonos (DG), ya que es la matriz con mayor cantidad de estos compuestos (**Figura 13**).



**Figura 14.** Análisis de componentes principales donde se muestra la relación entre los tres materiales vegetales (bagazo, lías y raspón) y los siete analitos estudiados; ácido gálico (AG), galato de metilo (MG), galato de etilo (EG), galato de propilo (PG), galato de butilo (BG), galato de octilo (OG) y galato de dodecilo (DG).

## 5.2. Bioaccesibilidad de galatos de alquilo

Hasta la fecha, no hay evidencias científicas que informen sobre la bioaccesibilidad de los derivados alquílicos del ácido gálico extraídos de subproductos enológicos. Para que un compuesto sea bioaccesible, debe extraerse durante el proceso de digestión gastrointestinal de la matriz vegetal en donde se encuentra, y, por tanto, no ser totalmente degradado durante dicho proceso, quedando de esta manera, biodisponible, para ser absorbido a nivel intestinal, pudiendo alcanzar la circulación sistémica y poder ejercer su acción biológica dentro del organismo, es decir, tendrá una determinada funcionalidad que habrá que evaluar. Con este fin y siendo uno de los objetivos principales del TFM, se realizaron simulaciones *in vitro* del proceso de digestión gástrica e intestinal por separado y del todo el proceso gastrointestinal en su conjunto,



evaluando la cantidad de ácido gálico libre y esterificado en las diferentes matrices digeridas.

En este contexto, la **Tabla 4** muestra la concentración de ácido gálico y sus derivados esterificados después de la simulación *in vitro* de digestión gastrointestinal en muestras de bagazo. Para obtener un mayor conocimiento sobre la transformación y estabilidad de los compuestos diana, se procedió a evaluar tanto la fracción soluble/bioaccessible como la fracción sólida residual.

**Tabla 4.** Contenido (ng/g) de ácido gálico y sus derivados esterificados tras la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro* en muestras de bagazo.

	Analitos (ng/g)						
	Ácido gálico	Galato de metilo	Galato de etilo	Galato de propilo	Galato de butilo	Galato de octilo	Galato de dodecilo
<i>Fracción Bioaccesible</i>							
Gástrica	6.29 ± 1.53 c	74.12 ± 3.88 a	507.25 ± 199.69 b	0.49 ± 0.15 b	1.62 ± 0.40 a	0.25 ± 0.16 a	1.12 ± 0.78 a
Gastrointestinal	310.08 ± 12.08 a	8.90 ± 1.71 b	645.88 ± 396.62 ab	2.01 ± 0.01 a	0.71 ± 0.13 a	0.17 ± 0.06 a	1.33 ± 0.88 a
Intestinal	58.41 ± 12.86 b	3.98 ± 0.79 b	1788.07 ± 116.96 a	2.30 ± 0.4 a	1.69 ± 1.39 a	0.11 ± 0.05 a	0.93 ± 0.03 a
<i>Fracción Residual</i>							
Gástrica	671.43 ± 48.33 a	22.26 ± 7.54 a	11.76 ± 7.95 b	0.90 ± 0.64 a	0.31 ± 0.29 a	0.14 ± 0.02 a	0.92 ± 0.13 a
Gastrointestinal	451.42 ± 32.99 b	12.60 ± 1.99 a	828.04 ± 388.90 b	0.67 ± 0.25 a	0.79 ± 0.14 a	0.30 ± 0.13 a	1.51 ± 0.77 a
Intestinal	218.76 ± 7.57 c	11.87 ± 0.48 a	2482.82 ± 227.94 a	0.76 ± 0.13 a	1.96 ± 0.95 a	0.07 ± 0.04 a	0.72 ± 0.34 a

Los datos corresponden a la media ± desviación estándar. Letras diferentes en las columnas (entre diferentes fases: gástrica, intestinal y gastrointestinal) de cada fracción (bioaccesible y residual) muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los distintos subconjuntos de datos por la prueba Tukey para todas las muestras experimentales.

En la fracción bioaccesible, el ácido gálico, presenta una concentración relativamente baja en todas las etapas de la digestión, lo que sugiere una liberación limitada durante este proceso. En un ambiente ácido como el estómago (pH 3), los grupos hidroxilo del ácido gálico pueden influir en la interacción con otros componentes presentes en el medio gástrico y formar agregados o complejos que dificultan su solubilidad y capacidad de disociación, contribuyendo a obtener una mayor concentración en la fracción residual para todas las etapas tal y como muestra la **Tabla 4**.

Es interesante destacar que, entre los derivados esterificados, el galato de etilo muestra una concentración considerable en todas las etapas de la digestión, alcanzando su valor máximo en la etapa intestinal ( $1788.07 \pm 116.96$  ng/g), lo que sugiere una mayor liberación de la matriz vegetal de este derivado esterificado y, por tanto, una mayor bioaccesibilidad. El galato de metilo también muestra una concentración considerable en todas las etapas, alcanzando su máximo valor en la etapa gástrica ( $74.12 \pm 3.88$  ng/g) (**Tabla 4**). Estos resultados sugieren una mayor bioaccesibilidad y liberación de los derivados esterificados en comparación con el ácido gálico no esterificado. Los demás compuestos esterificados, galato de propilo, butilo, octilo y dodecilo, presentan concentraciones inferiores, no observándose diferencias significativas entre las fracciones bioaccesibles para las tres simulaciones digestivas, lo que sugiere que la hidrólisis enzimática puede haber sido limitada por la longitud de las cadenas alquílicas (Wang *et al.*, 2021).

La esterificación del ácido gálico a diferentes alcoholes puede tener un impacto en su capacidad de ser hidrolizado durante la digestión. La hidrólisis enzimática de los ésteres está mediada por enzimas específicas, como las lipasas intestinales, que pueden tener afinidad por ciertas longitudes de cadena alquílica (Wang *et al.*, 2021). Un estudio reciente llevado a cabo por Wang *et al.*, 2022 realizado para evaluar la digestión gastrointestinal de galatos de alquilo demostró como en comparación con una cadena hidrofílica corta (C4), una cadena hidrofóbica más larga (C8) no puede garantizar la ubicación interfacial enzimática adecuada lo que implica un grado de hidrólisis menor. En nuestro estudio, podemos afirmar un comportamiento similar, ya que para los galatos de etilo (C2) y propilo (C3) se observan concentraciones significativas en la fracción

bioaccesible intestinal, lo que evidencia que para galatos de alquilo, las cadenas alquílicas cortas pueden favorecer la ubicación interfacial adecuada de las lipasas intestinales y pancreáticas, dando lugar un grado de hidrólisis mayor (Wang *et al.*, 2022).

En relación con otro subproducto estudiado en el TFM derivado de la precipitación de residuos semisólidos que se forman durante la elaboración del vino, hemos observado que en la fracción bioaccesible de las lías, el ácido gálico presenta una concentración en la etapa gástrica de  $15.91 \pm 1.68$  ng/g, mientras que, en la etapa gastrointestinal, aumenta significativamente a  $244.53 \pm 66.40$  ng/g, sin embargo, en la etapa intestinal, la concentración disminuye a  $31.69 \pm 23.85$  ng/g (**Tabla 5**). Este hecho, podría deberse a la hidrólisis de compuestos fenólicos más complejos conjugados con ácido gálico a pH ácido durante la fase gastrointestinal que tiene una duración mayor que la fase individual gástrica en la simulación *in vitro*, 4 h. *versus* 2 h. No obstante, en la fracción residual para cada simulación, observamos como el ácido gálico muestra concentraciones significativas con respecto a la fracción bioaccesible,  $399.82 \pm 33.34$  ng/g para la fase gástrica,  $164.48 \pm 70.78$  ng/g para la fase intestinal y  $536.94 \pm 69.91$  ng/g para la digestión gastrointestinal y, concluyendo que gran parte del ácido gálico presente en las lías no ha sido liberado de la matriz, quedando una fracción residual, que *in vivo* podría metabolizarse por la microbiota intestinal hacia nuevos metabolitos como pirogalol y sus conjugados glucurónidos y sulfatos, para lo que se necesitarían futuras investigaciones en esta línea (Yang *et al.*, 2020).

**Tabla 5.** Contenido (ng/g) de ácido gálico y sus derivados esterificados tras la simulación de la digestión intestinal *in vitro* en muestras de lías.

	Analitos (ng/g)						
	Ácido gálico	Galato de metilo	Galato de etilo	Galato de propilo	Galato de butilo	Galato de octilo	Galato de dodecilo
<i>Fracción Bioaccesible</i>							
Gástrica	15.91 ± 1.68 b	20.11 ± 1.64 b	11617.00 ± 445.62 a	5.62 ± 1.29 a	21.90 ± 0.47 a	0.29 ± 0.18 a	2.21 ± 1.57 a
Gastrointestinal	244.53 ± 66.40 a	24.62 ± 1.68 ab	20883.77 ± 6656.32 a	11.19 ± 2.73 a	23.23 ± 4.96 a	0.92 ± 0.30 a	1.85 ± 0.95 a
Intestinal	31.69 ± 23.85 b	27.10 ± 0.92 a	22235.91 ± 483.99 a	10.25 ± 3.61 a	21.86 ± 0.13 a	0.15 ± 0.00 a	0.98 ± 0.14 a
<i>Fracción Residual</i>							
Gástrica	399.82 ± 33.34 ab	27.57 ± 14.96 a	3557.67 ± 463.34 a	1.99 ± 1.33 a	9.30 ± 2,54 a	0.45 ± 0.18 a	1.26 ± 0.70 a
Gastrointestinal	536.94 ± 69.91 a	47.13 ± 3.87 a	6447.70 ± 571.12 a	2.12 ± 0.93 a	8.91 ± 0,35 a	0.27 ± 0.14 a	2.97 ± 1.76 a
Intestinal	164.48 ± 70.78 b	15.00 ± 7.45 a	5770.8 ± 1665.24 a	1.19 ± 0.07 a	1.93 ± 0,70 b	0.20 ± 0.11 a	0.30 ± 0.06 a

Los datos corresponden a la media ± desviación estándar. Letras diferentes en las columnas (entre diferentes fases: gástrica, intestinal y gastrointestinal) de cada fracción (bioaccesible y residual) muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los distintos subconjuntos de datos por la prueba Tukey para todas las muestras experimentales.

Por otro lado, en la fracción bioaccessible del ácido gálico esterificado con metanol observamos solo diferencias significativas entre la digestión gástrica e intestinal, alcanzando valores de  $20.11 \pm 1.64$  ng/g, y  $27.10 \pm 0.92$  ng/g, respectivamente, que pueden deberse, por un lado, a la hidrólisis del compuesto a pH ácido y también, a una potencial formación del éster en la fase intestinal por acción de las enzimas con actividad lipasa.

Tal y como observamos en la **Tabla 5** el galato de etilo es uno de los componentes más abundantes en lías tras la simulación de la digestión, superando en tres órdenes de magnitud al resto de derivados esterificados, obteniendo porcentajes de bioaccesibilidad en torno a 900% específicamente para esta matriz vegetal, si comparamos la abundancia de este compuesto en la matriz antes de digerir y después de la simulación de la digestión gastrointestinal (**Figura 13, Tabla 5**). Estos resultados están en consonancia con otros estudios donde observaron que el ácido gálico esterificado con etanol se producía en muestras digeridas de cacao blanco (*Theobroma grandiflorum*), en comparación con las muestras no digeridas, donde no fue detectado (Andrade *et al.*, 2022).

Para los demás compuestos esterificados, galatos de propilo (C3), de butilo (C4), de octilo (C8) y de dodecilo (C12) no observamos diferencias significativas para cada simulación digestiva (gástrica, intestinal y gastrointestinal) en la fracción bioaccessible, mostrando cantidades muy reducidas. Estos resultados sugieren que tanto la longitud de la cadena alquílica como la estructura química de los compuestos esterificados puede influir en su bioaccesibilidad y retención durante la digestión *in vitro* de las muestras de lías. Así como, otro de los factores que puede estar influyendo es la abundancia de las moléculas parentales (ácido gálico y el correspondiente alcohol para formar la esterificación).

Con respecto a los resultados obtenidos del análisis de la fracción residual de la simulación digestiva, no hubo diferencias entre las fases en relación a la cantidad de moléculas esterificadas ( $p > 0.05$ ), a excepción de galato de butilo (**Tabla 5**). Asimismo, el ácido gálico presentó una reducción significativa en la fase intestinal, que podría ser debida a la formación de esterificaciones con alcoholes libres y la consecuente formación de derivados alquílicos (**Tabla 5**).

Estos hallazgos están de acuerdo con estudios anteriores realizados sobre la evaluación de la bioaccesibilidad de lipofenoles de hidroxitirosol, moléculas de hidroxitirosol esterificadas con ácidos grasos mono- y poliinsaturados, presentes en el aceite de oliva virgen extra (Alemán Jiménez *et al.*, 2021). En consecuencia, el estudio realizado en aceite de oliva virgen extra, encontró que la bioaccesibilidad de los derivados de hidroxitirosol depende en gran medida tanto del tipo de ácido graso que esterifica la molécula del ácido fenólico, como de la matriz alimentaria. Además, se observó la generación de derivados esterificados de hidroxitirosol durante la digestión intestinal (con pancreatina) siendo la enzima responsable, en mayor medida, de la formación *de novo* de derivados lipofenólicos.

En relación a la composición cuantitativa de ácido gálico y sus derivados esterificados en raspón de uva, un subproducto enológico infrautilizado, tras la simulación *in vitro* del proceso digestivo (**Tabla 6**), la fracción bioaccesible, para el ácido gálico se observa que, en la etapa gastrointestinal aumenta ( $64.32 \pm 19.06$  ng/g) con respecto a las fases individuales (gástrica e intestinal), al igual que ocurría con los otros dos subproductos vitivinícolas analizados. Estas diferencias indican que el ácido gálico es más accesible durante la etapa gastrointestinal en comparación con la intestinal al igual que en las muestras de bagazo y lías tal y como se ha mencionado anteriormente, debido posiblemente a la formación de ésteres alquílicos en la fase intestinal.

**Tabla 6.** Contenido (ng/g) de ácido gálico y sus derivados esterificados tras la simulación de la digestión *in vitro* en muestras de raspón.

	Analitos (ng/g)						
	Ácido gálico	Galato de metilo	Galato de etilo	Galato de propilo	Galato de butilo	Galato de octilo	Galato de dodecilo
<i>Fracción Bioaccesible</i>							
Gástrica	34.73 ± 12.34 a	2.08 ± 1.30 a	1029.78 ± 777.72 b	3.70 ± 1.75 b	15.34 ± 8.82 a	0.18 ± 0.05 a	3.59 ± 0.72 a
Gastrointestinal	64.32 ± 19.06 a	1.64 ± 0.68 a	3447.69 ± 1273.54 ab	10.05 ± 2.22 ab	13.08 ± 2.11 a	0.45 ± 0.14 a	1.62 ± 0.79 a
Intestinal	24.77 ± 4.01 a	2.17 ± 0.78 a	5387.83 ± 112.60 a	21.51 ± 3.84 a	11.82 ± 2.07 a	0.18 ± 0.07 a	0.91 ± 0.13 a
<i>Fracción Residual</i>							
Gástrica	< LOD	0.76 ± 0.19 a	1.12 ± 0.26 b	0.20 ± 0.11 b	0.37 ± 0.13 b	0.03 ± 0.00 a	< LOD
Gastrointestinal	< LOD	1.27 ± 0.29 a	58.31 ± 51.85 b	0.42 ± 0.21 b	1.48 ± 0.56 b	0.10 ± 0.06 a	< LOD
Intestinal	< LOD	4.70 ± 1.98 a	2850 ± 413.33 a	3.99 ± 0.98 a	4.96 ± 0.43 a	0.02 ± 0.01 a	0.54 ± 0.12 a

Los datos corresponden a la media ± desviación estándar. Letras diferentes en las columnas (entre diferentes fases: gástrica, intestinal y gastrointestinal) de cada fracción (bioaccesible y residual) muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los distintos subconjuntos de datos por la prueba Tukey para todas las muestras experimentales



En lo que respecta a los derivados esterificados, el galato de etilo mostró una concentración notablemente elevada en comparación con los otros analitos estudiados en la fracción bioaccesible. Tanto para este compuesto como para galato de propilo la concentración aumenta en gran medida en la fase intestinal, observándose una concentración promedio de  $5387.83 \pm 112.60$  ng/g y  $21.51$  ng/g  $\pm 3.84$  ng/g, respectivamente (**Tabla 6**). Estos hallazgos corroboran los resultados obtenidos por Wang *et al.*, 2022, sugiriendo que los galatos de alquilo de cadena alquílicas cortas (C3 y C4) pueden actuar favoreciendo la ubicación interfacial de las lipasas enzimáticas, contribuyendo a un mayor grado de hidrólisis y, por lo tanto, obtener un mayor contenido de los mismos en la fracción bioaccesible.

Para los demás derivados esterificados, independientemente de la longitud de cadena alquílica, se observan concentraciones muy bajas en la fracción bioaccesible, dichas cantidades pueden estar viéndose influenciadas por la composición química de la matriz vegetal, ya que el raspón es una matriz vegetal muy rica en fibra, polisacáridos y proteínas, entre otros, que pueden estar interactuando con los compuestos fenólicos, formando complejos y reduciendo su solubilidad, lo que dificulta su liberación durante la digestión, y por tanto, obteniendo cantidades más reducidas.

Por otro lado, en la fracción residual del raspón tras la digestión (**Tabla 6**), para el ácido gálico se observaron concentraciones por debajo del límite de detección (LOD del inglés, '*limit of detection*') en todas las etapas de la digestión. A su vez, los demás derivados esterificados mostraron abundancias muy bajas, que pueden estar asociadas a la actividad de las enzimas digestivas. Es posible que se hayan formado metabolitos más pequeños y menos detectables, o que los analitos hayan sido transformados en otros metabolitos o conjugados con otras moléculas y no se pueden detectar con el método analítico utilizado.



## 6. CONCLUSIONES

Según los objetivos planteados en este estudio, se puede concluir lo siguiente:

1. Los compuestos más abundantes en los subproductos de vinificación estudiados fueron el ácido gálico y el galato de etilo. Según los resultados de nuestro estudio, el bagazo es la matriz con mayor contenido en ácido gálico libre y las lías representan el subproducto enológico con más cantidad de ácido gálico esterificado con etanol, por lo que, ambos residuos (bagazo y lías), serían interesantes fuentes para la obtención de ingredientes ricos en antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos, respectivamente.

2. Los derivados esterificados del ácido gálico son bioaccesibles, al ser extraídos de la matriz vegetal durante la simulación *in vitro* de digestión gastrointestinal. Dicha bioaccesibilidad depende, tanto de la matriz vegetal, como del tipo de alcohol esterificado al ácido gálico, destacando la formación *de novo* de los derivados alquílicos por enzimas con actividad lipasa tras la simulación de la fase intestinal. Estos hallazgos, abren la puerta a futuras investigaciones para desarrollar distintas vías de revalorización de los residuos enológicos y evaluar su funcionalidad como ingredientes bioactivos con un interés tecnológico y biológico aplicado a la industria agroalimentaria.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, F., Crebelli, R., Dusemund, B., Galtier, P., Gott, D., Gundert-Remy, U., König, J., Lambré, C., Leblanc, J.-C., Mortensen, A., Mosesso, P., Oskarsson, A., Parent-Massin, D., Rose, M., Stankovic, I., Tobback, P., Waalkens-Berendsen, I., Woutersen, R. A., Wright, M., Pratt, I. (2014). Scientific Opinion on the re-evaluation of propyl gallate (E 310) as a food additive. *EFSA Journal*, 12, 3642. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2014.3642>

Agulló, V., Moreno, D. A., Domínguez-Perles, R., & García-Viguera, C. (2022). Contribution of the diverse experimental models to unravelling the biological scope of dietary (poly)phenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(10), 3940-3951. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11865>

Alemán-Jiménez, C., Domínguez-Perles, R., Gallego-Gómez, J. I., Simonelli-Muñoz, A., Moine, E., Durand, T., Crauste, C., Ferreres, F., Gil-Izquierdo, Á., & Medina, S. (2021). Fatty Acid Hydroxytyrosyl Esters of Olive Oils Are Bioaccessible According to Simulated In Vitro Gastrointestinal Digestion: Unraveling the Role of Digestive Enzymes on Their Stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(47), 14165-14175. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c05373>

Andrade, J. K. S., Barros, R. G. C., Pereira, U. C., Gualberto, N. C., de Oliveira, C. S., Shanmugam, S., & Narain, N. (2022).  $\alpha$ -Amylase inhibition, cytotoxicity and influence of the in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds in the peel and seed of *Theobroma grandiflorum*. *Food Chemistry*, 373, 131494. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131494>

Baldán, Y., Riveros, M., Fabani, M. P., & Rodriguez, R. (2021). Grape pomace powder valorization: A novel ingredient to improve the nutritional quality of gluten-free muffins. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01829-8>

Balli, D., Cecchi, L., Innocenti, M., Bellumori, M., & Mulinacci, N. (2021). Food by-products valorisation: Grape pomace and olive pomace (pâté) as

sources of phenolic compounds and fiber for enrichment of tagliatelle pasta. *Food Chemistry*, 355, 129642. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129642>

Base de datos | OIV. (s. f.). Recuperado 16 de mayo de 2023, de <https://www.oiv.int/es/what-we-do/data-discovery-report?oiv>

Bhuia, Md. S., Rahaman, Md. M., Islam, T., Bappi, M. H., Sikder, Md. I., Hossain, K. N., Akter, F., Al Shamsh Prottay, A., Rokonuzzman, Md., Güreer, E. S., Calina, D., Islam, M. T., & Sharifi-Rad, J. (2023). Neurobiological effects of gallic acid: Current perspectives. *Chinese Medicine*, 18(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s13020-023-00735-7>

Bolenz, S., & Glöde, L. (2021). Technological and nutritional aspects of milk chocolate enriched with grape pomace products. *European Food Research and Technology*, 247(3), 623-636. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03651-4>

Bontpart, T., Marlin, T., Vialet, S., Guiraud, J.-L., Pinasseau, L., Meudec, E., Sommerer, N., Cheynier, V., & Terrier, N. (2016). Two shikimate dehydrogenases, VvSDH3 and VvSDH4, are involved in gallic acid biosynthesis in grapevine. *Journal of Experimental Botany*, 67(11), 3537-3550. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw184>

Brodkorb, A., Egger, L., Almingier, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), Art. 4. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>

Carpentieri, S., Larrea-Wachtendorff, D., Donsì, F., & Ferrari, G. (2022). Functionalization of pasta through the incorporation of bioactive compounds from agri-food by-products: Fundamentals, opportunities, and drawbacks. *Trends in Food Science & Technology*, 122, 49-65. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.02.011>

Costa-Pérez, A., Medina, S., Sánchez-Bravo, P., Domínguez-Perles, R., & García-Viguera, C. (2023). The (Poly)phenolic Profile of Separate Winery By-

Products Reveals Potential Antioxidant Synergies. *Molecules*, 28(5), Art. 5. <https://doi.org/10.3390/molecules28052081>

Crauste, C., Rosell, M., Durand, T., & Vercauteren, J. (2016). Omega-3 polyunsaturated lipophenols, how and why? *Biochimie*, 120, 62-74. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.07.018>

*Estrategia Española de Economía Circular y Planes de Acción*. (s. f.). Recuperado 28 de mayo de 2023, de <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/economia-circular/estrategia/>

Fang, F., Li, J.-M., Zhang, P., Tang, K., Wang, W., Pan, Q.-H., & Huang, W.-D. (2008). Effects of grape variety, harvest date, fermentation vessel and wine ageing on flavonoid concentration in red wines. *Food Research International*, 41(1), 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.09.004>

Fernandes, F. H. A., & Salgado, H. R. N. (2016). Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 46(3), 257-265. <https://doi.org/10.1080/10408347.2015.1095064>

Ferrer-Gallego, R., & Silva, P. (2022). The Wine Industry By-Products: Applications for Food Industry and Health Benefits. *Antioxidants*, 11(10), Art. 10. <https://doi.org/10.3390/antiox11102025>

Gaglio, R., Barbaccia, P., Barbera, M., Restivo, I., Attanzio, A., Maniaci, G., Di Grigoli, A., Francesca, N., Tesoriere, L., Bonanno, A., Moschetti, G., & Settanni, L. (2021). The Use of Winery by-Products to Enhance the Functional Aspects of the Fresh Ovine «Primosale» Cheese. *Foods* 10(2), 461. <https://doi.org/10.3390/foods10020461>

Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*, 30(11), 591-600. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.08.001>

Gutiérrez-Grijalva, E. P., Ambriz-Pérez, D. L., Leyva-López, N., Castillo-López, R. I., & Heredia, J. B. (2016). Review: Dietary phenolic compounds, health

benefits and bioaccessibility. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 66(2), 87-100.

Hotelling, H. (1933). Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of Educational Psychology*, 24(6), 417-441. <https://doi.org/10.1037/h0071325>

López-Astorga, M., Molina-Quijada, C. C., Ovando-Martínez, M., Leon-Bejarano, M., López-Astorga, M., Molina-Quijada, C. C., Ovando-Martínez, M., & Leon-Bejarano, M. (2022). Orujo de uva: Más que un residuo, una fuente de compuestos bioactivos. *Epistemus (Sonora)*, 16(33), 115-122. <https://doi.org/10.36790/epistemus.v16i33.283>

Lou, W., Bo Li, B., & Nataliya G.. (2021). The influence of Cabernet Sauvignon wine grape pomace powder addition on the rheological and microstructural properties of wheat dough. *CyTA: Journal of Food*, 19(1), 751-761. <https://doi.org/10.1080/19476337.2021.1981458>

Maicas, S., & Mateo, J. J. (2020). Sustainability of Wine Production. *Sustainability*, 12(2), Art. 2. <https://doi.org/10.3390/su12020559>

Milinčić, D. D., Stanisavljević, N. S., Kostić, A., Soković Bajić, S., Kojić, M. O., Gašić, U. M., Barać, M. B., Stanojević, S. P., Lj Tešić, Ž., & Pešić, M. B. (2021). Phenolic compounds and biopotential of grape pomace extracts from Prokupac red grape variety. *LWT—Food Science and Technology*, 138, 110739. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.110739>

Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Feunteun, S. L., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113-1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>

Monagas, M., Suarez, R., Gomez-Cordoves, C., & Bartolome, B. (2005). Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines



by HPLC-DAD/ESI-MS. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56, 139-147. <https://doi.org/10.5344/ajev.2005.56.2.139>

Pavlou, A., Melikidou, I., Petridis, D., Panayiotou, C., & Ritzoulis, C. (2021). Winery By-product Hydrocolloids as Texture Modifiers in Yogurt Formulations. *Journal of Culinary Science & Technology*, 19(4), 352-371. <https://doi.org/10.1080/15428052.2020.1768996>

Pazos, M., Gallardo, J. M., Torres, J. L., & Medina, I. (2005). Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chemistry*, 92(3), 547-557. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.07.036>

Pearson, K. (1901). LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 2(11), 559-572. <https://doi.org/10.1080/14786440109462720>

Ruggieri, L., Cadena, E., Martínez-Blanco, J., Gasol, C. M., Rieradevall, J., Gabarrell, X., Gea, T., Sort, X., & Sánchez, A. (2009). Recovery of organic wastes in the Spanish wine industry. Technical, economic and environmental analyses of the composting process. *Journal of Cleaner Production*, 17(9), 830-838. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2008.12.005>

Silva, A., Silva, V., Igrejas, G., Aires, A., Falco, V., Valentão, P., & Poeta, P. (2023). Phenolic compounds classification and their distribution in winemaking by-products. *European Food Research and Technology*, 249(2), 207-239. <https://doi.org/10.1007/s00217-022-04163-z>

Tolve, R., Simonato, B., Rainero, G., Bianchi, F., Rizzi, C., Cervini, M., & Giuberti, G. (2021). Wheat Bread Fortification by Grape Pomace Powder: Nutritional, Technological, Antioxidant, and Sensory Properties. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(1), 75. <https://doi.org/10.3390/foods10010075>

Troilo, M., Difonzo, G., Paradiso, V. M., Summo, C., & Caponio, F. (2021). Bioactive Compounds from Vine Shoots, Grape Stalks, and Wine Lees: Their Potential Use in Agro-Food Chains. *Foods*, 10(2), Art. 2. <https://doi.org/10.3390/foods10020342>

Tseng, A., & Zhao, Y. (2013). Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. *Food Chemistry*, 138(1), 356-365. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.148>

Viada Pupo, E., Gómez Robles, L., & Campaña Marrero, I. R. (2017). Estrés oxidativo. *CCH, Correo cient. Holguín*, 171-186.

Wang, Y., Li, F., Zhuang, H., Chen, X., Li, L., Qiao, W., & Zhang, J. (2015). Effects of plant polyphenols and  $\alpha$ -tocopherol on lipid oxidation, residual nitrites, biogenic amines, and N-nitrosamines formation during ripening and storage of dry-cured bacon. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 199-206. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.022>

Wang, X., Chen, K., Zhang, X., Hu, Y., Wang, Z., Yin, F., Liu, X., Zhang, J., Qin, L., & Zhou, D. (2021). Effect of carbon chain length on the hydrolysis and transport characteristics of alkyl gallates in rat intestine. *Food & Function*, 12(21), 10581-10588. <https://doi.org/10.1039/D1FO01732B>

Wang, X., Wang, Q., Hu, Y., Yin, F., Liu, X., & Zhou, D. (2022). Gastrointestinal Digestion and Microbial Hydrolysis of Alkyl Gallates: Potential Sustained Release of Gallic Acid. *Foods*, 11(23), Art. 23. <https://doi.org/10.3390/foods11233936>

Wianowska, D., & Olszowy-Tomczyk, M. (2023). A Concise Profile of Gallic Acid—From Its Natural Sources through Biological Properties and Chemical Methods of Determination. *Molecules*, 28(3), Art. 3. <https://doi.org/10.3390/molecules28031186>

Wohlgemuth, R., Twardowski, T., & Aguilar, A. (2021). Bioeconomy moving forward step by step – A global journey. *New Biotechnology*, 61, 22-28. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.11.006>

Xu, C., Yagiz, Y., Marshall, S., Li, Z., Simonne, A., Lu, J., & Marshall, M. R. (2015). Application of muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.) pomace extract to reduce carcinogenic acrylamide. *Food Chemistry*, 182, 200-208. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.133>

Yang, K., Zhang, L., Liao, P., Xiao, Z., Zhang, F., Sindaye, D., Xin, Z., Tan, C., Deng, J., Yin, Y., & Deng, B. (2020). Impact of Gallic Acid on Gut Health: Focus on the Gut Microbiome, Immune Response, and Mechanisms of Action. *Frontiers in Immunology*, 11, 580208. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.580208>

Zeppa, G., Tedesco, M., Bertolino, M., & Çilek Tatar, B. (2021). Grape Pomace as a New Coagulant for Tofu Production: Physicochemical and Sensory Effects. *Foods* 10(8), 1857. <https://doi.org/10.3390/foods10081857>

Zhao, M.-T., Liu, Z.-Y., Li, A., a, G.-H., Xie, H.-K., Zhou, D.-Y., & Wang, T. (2021). Gallic acid and its alkyl esters emerge as effective antioxidants against lipid oxidation during hot air drying process of *Ostrea talienwhanensis*. *LWT*, 139, 110551. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110551>

