



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Desarrollo de galletas funcionales a base de orujo de uva Tannat estudiando la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de sus compuestos bioactivos

María Victoria Olt Pardo

Presentada como uno de los requisitos para acceder al título de **Magíster en Química**

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química, Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Abril, 2024

**Desarrollo de galletas funcionales a base de orujo de uva
Tannat estudiando la bioaccesibilidad y biodisponibilidad
de sus compuestos bioactivos**

Tribunal:

Dra. Laura Fariña

Dra. Caterina Rufo

Dra. Jara Pérez

Directores de Tesis:

Dra. Alejandra Medrano

Dra. Adriana Maite Fernández

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que, de una forma u otra, contribuyeron al desarrollo de esta tesis y a mi formación profesional y personal, porque ambas van de la mano.

En primer lugar, quiero agradecerles a mis directoras de tesis, Alejandra Medrano y Adriana Fernández, quienes, desde hace más de 4 años, cuando me acerqué a ellas para culminar mi carrera de grado, me han guiado en este camino y están siempre dispuestas al intercambio y a ayudar. Ale, gracias una vez más por abrirme las puertas y confiar en mí. Adri, gracias por tu compromiso constante para que las cosas salgan adelante.

Muchas gracias a Eduardo Dellacassa, Romina Curbelo, Eduardo Boido, Miguel Amarillo y Adriana Gámbaro por su entusiasta participación en el desarrollo de etapas esenciales de esta tesis. A Analía Abraham, Carolina Dardis y Agustina Bengoa del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, Argentina, por recibirme en su laboratorio y brindarme su apoyo para culminar los últimos experimentos de la tesis.

Gracias a mis compañeros de CYTAL, y sobre todo del área de Química de Alimentos, en especial a Jessi, Flo, Meli y Mati, por todo el tiempo compartido dentro y fuera del laboratorio.

A mis amigas de la vida que siempre me han apoyado, y a mis amigos de la Facultad de Ciencias, un grupo hermoso con quienes he recorrido este mismo camino científico.

Muchas gracias a mis padres y a mi hermano que son todo para mí y sin su apoyo y amor constante este camino no hubiese sido el mismo. Gracias a Juan, por compartir la vida día a día y confiar en mí como nadie.

Por último, quiero agradecer a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (beca de Maestría POS_NAC_M_2020_1_164532, beca de capacitación en el exterior MOV_CA_2022_1_175318), a la Comisión Académica de Posgrado y a PEDECIBA, cuyas financiaciones hicieron posible la realización de esta investigación.

A todas estas personas e instituciones, todos mis agradecimientos de corazón.

**Desarrollo de galletas funcionales a base de orujo de uva Tannat estudiando
la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de sus compuestos bioactivos**

María Victoria Olt Pardo

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

2024

Directores de Tesis:

Dra. Alejandra Medrano

Dra. Adriana Maite Fernández

Facultad de Química, Universidad de la República

La producción de vino tinto Tannat (*Vitis vinifera* cv. Tannat) en Uruguay es emblemática y ha otorgado al país reconocimiento en el mundo del vino. Sin embargo, el proceso de elaboración del vino conlleva a la generación de una gran cantidad de subproductos sólidos, cuya gestión inadecuada tiene un impacto negativo en el medio ambiente y en diversos aspectos sociales y económicos. Entre estos subproductos, el orujo de uva se destaca como uno de los principales residuos generados en la producción vinícola, y tradicionalmente su gestión ha sido poco sostenible y respetuosa con el medio ambiente. No obstante, recientemente ha surgido un creciente interés en aprovechar dicho subproducto de manera sostenible, especialmente como ingrediente funcional, debido a su contenido en compuestos fenólicos y fibra dietética, lo que podría proporcionar beneficios para la salud del consumidor. La utilización de subproductos agroalimentarios en el desarrollo de alimentos representa una estrategia eficaz para aprovechar los

recursos naturales disponibles y promover tanto la salud del consumidor como el desarrollo sostenible.

En este contexto, el presente trabajo de maestría propuso utilizar el orujo de uva Tannat (TGP, por sus siglas en inglés) como un potencial ingrediente funcional en la elaboración de diferentes formulaciones de galletas, variando tanto la cantidad de subproducto (TGP) como el edulcorante (sucralosa) a incorporar.

Dentro de los objetivos del estudio se incluyó obtener el perfil sensorial y la aceptabilidad de las formulaciones de galletas desarrolladas, así como la determinación de sus propiedades bioactivas (propiedad antioxidante, antidiabética y antiobesidad). Con el fin de determinar el impacto del procesamiento del alimento en los compuestos bioactivos se propuso identificar mediante HPLC-DAD-MS los compuestos fenólicos en la galleta con TGP. En líneas generales, las galletas mostraron una buena calidad sensorial y, además, mostraron capacidad de inhibir enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y lípidos, así como de exhibir propiedades antioxidantes, lo cual puede atribuirse a los compuestos fenólicos identificados en la galleta con TGP.

Como siguiente objetivo se propuso comprender cómo los compuestos bioactivos presentes en las galletas con TGP se comportan luego de la digestión gastrointestinal, dado que este proceso puede afectar su biodisponibilidad, es decir, su capacidad para ser absorbidos y ejercer sus efectos biológicos. Para ello, se llevó a cabo una simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro* obteniéndose las Fracciones Bioaccesibles (FB) y Fracciones Colónicas (FC) de las galletas. Sobre estas fracciones se determinaron las propiedades bioactivas mencionadas anteriormente, además de realizar determinaciones de la capacidad antioxidante y antiinflamatoria en células intestinales y células del sistema inmune, respectivamente. Sobre la FC se realizó la identificación de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD-MS. Además, con el propósito de identificar qué compuestos podrían estar potencialmente biodisponibles en la FC, se identificaron los compuestos fenólicos captados por una monocapa de células intestinales. Como último objetivo se evaluó la capacidad prebiótica de la FC de la galleta con TGP en un modelo de fermentación *in*

vitro, completando así el análisis integral de estas formulaciones innovadoras. En resumen, los resultados de las propiedades bioactivas, tanto a nivel acelular como celular, sugieren que los compuestos fenólicos provenientes del TGP luego de la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro*, no son bioaccesibles al ser incorporados a una matriz alimentaria como la de la galleta. Por otro lado, estos compuestos parecen quedar retenidos en la FC lo que concuerda con la presencia de compuestos fenólicos en dicha fracción. Además, se observó que ciertos compuestos fenólicos presentes en la FC de la galleta con TGP mostraron capacidad para ingresar a la célula intestinal con potencial biodisponibilidad. Finalmente, los resultados de la fermentación *in vitro* indicaron que los compuestos fenólicos en la FC de la galleta con TGP presentan capacidad para modular la microbiota intestinal, sugiriendo su potencial para ejercer un efecto positivo en la misma.

Estos hallazgos sugieren que el orujo de uva Tannat tiene un gran potencial como ingrediente funcional para desarrollar alimentos que promuevan la buena salud, ya que las galletas desarrolladas hasta el momento han mostrado el potencial para contribuir a reducir el riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles. Además, estos resultados son alentadores para avanzar en las siguientes etapas del desarrollo de alimentos funcionales.

Palabras claves: bioaccesibilidad; biodisponibilidad; compuestos fenólicos; digestión gastrointestinal; fibra dietaria; galletas funcionales; orujo de uva Tannat; propiedades bioactivas; subproducto agroalimentario.

Development of functional biscuits with Tannat grape pomace studying the bioaccessibility and bioavailability of its bioactive compounds.

María Victoria Olt Pardo

Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química

Universidad de la República

2024

Thesis Supervisors:

Dra. Alejandra Medrano

Dra. Adriana Maite Fernández

Facultad de Química, Universidad de la República

The production of Tannat red wine (*Vitis vinifera* cv. Tannat) in Uruguay is emblematic, since it has given us a recognized position in the wine world. However, the winemaking process involves the generation of a large amount of solid by-products, whose inadequate management has a negative impact on the environment and on the social and economic aspects of the region. Grape pomace, the primary solid byproduct generated during wine production is traditionally managed in non-sustainable or environmentally friendly ways. In recent years, there has been a growing interest in the sustainable utilization of this byproduct especially as a functional ingredient, given its content of phenolic compounds and dietary fiber, which could have health benefits for the consumer. The utilization of agri-food byproducts in food development represents an effective strategy to make use of available natural resources and promote both consumer health and sustainable development.

In this context, the present master's thesis proposed using Tannat grape pomace (TGP) as a potential functional ingredient in the development of different biscuit formulations, varying both the amount of by-product and the sweetener (sucralose) to be incorporated.

The study objectives included obtaining the sensory profile and acceptability of the developed biscuit formulations and determining their bioactive properties (antioxidant, antidiabetic, and antiobesity properties). In order to determine the impact of food processing on bioactive compounds, it was proposed to identify phenolic compounds in the TGP biscuit using HPLC-DAD-MS. Overall, the biscuits showed good sensory quality and demonstrated the ability to inhibit enzymes related to carbohydrate and lipid metabolism, as well as exhibit antioxidant properties, which may be attributed to the phenolic compounds identified in the TGP biscuit.

As the next objective, it was proposed to understand how the bioactive compounds present in the TGP biscuits behave after gastrointestinal digestion, since this process can affect their bioavailability, which implies their ability to be absorbed and exert their biological effects. To this end, an *in vitro* gastrointestinal digestion simulation was carried out, obtaining Bioaccessible Fractions (BF) and Colonic Fractions (CF) of the biscuits. The aforementioned bioactive properties were determined on these fractions, in addition to antioxidant and anti-inflammatory capacity determinations in intestinal and immune system cells, respectively. Phenolic compounds were identified in the CF using HPLC-DAD-MS. Additionally, with the purpose of identifying potentially bioavailable compounds in the CF, phenolic compounds captured by a monolayer of intestinal cells were identified. As a final objective, the prebiotic capacity of the TGP biscuit CF was evaluated in an *in vitro* fermentation model, thus completing the comprehensive analysis of these innovative formulations. In summary, the results of the bioactive properties at both acellular and cellular levels, suggest that phenolic compounds from TGP after *in vitro* gastrointestinal digestion simulation are not bioaccessible when incorporated into a food matrix such as the biscuit. On the other hand, these compounds seem to be retained in the CF, which is consistent with the presence of phenolic compounds in that fraction. Additionally, it was observed that certain phenolic compounds present in the TGP biscuit CF showed the

ability to enter intestinal cells with potential bioavailability. Finally, the results of the *in vitro* fermentation indicated that phenolic compounds in the TGP biscuit CF have the capacity to modulate intestinal microbiota, suggesting their potential to exert a positive effect on it.

These findings suggest that Tannat grape pomace has great potential as a functional ingredient for developing health-promoting foods, as the biscuits developed so far have shown potential to contribute to reducing the risk of non-communicable chronic diseases. Additionally, these results are encouraging for advancing to the next stages of functional food development.

Keywords: agri-food byproducts; bioaccessibility; bioactive properties; bioavailability; dietary fiber; functional biscuit; gastrointestinal digestion; phenolic compounds; Tannat grape pomace.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Economía circular	2
1.1.1. Circularidad en las industrias agroalimentarias.....	2
1.2. El orujo de uva como residuo a ser valorizado	3
1.2.1. Composición del orujo de uva	6
1.2.1.1. Compuestos fenólicos.....	6
1.2.1.2. Fibra	9
1.2.1.3. Fibra antioxidante	11
1.2.1.4. Componentes minoritarios	12
1.2.2. Beneficios saludables del orujo de uva	12
1.2.2.1. Capacidad antioxidante.....	14
1.2.2.2. Capacidad antidiabética	15
1.2.2.3. Capacidad antiobesidad	17
1.2.2.4. Capacidad antiinflamatoria.....	18
1.2.2.5. Capacidad prebiótica	20
1.2.3. Uso de orujo de uva en la formulación de alimentos y sus desafíos.....	21
1.3. Proceso de digestión gastrointestinal	23
1.3.1. Etapas del proceso de digestión gastrointestinal	24
1.3.2. Metabolismo de los compuestos fenólicos en el tracto gastrointestinal.....	27
2. OBJETIVOS.....	34
2.1. Objetivo general.....	35
2.2. Objetivos específicos	35
3. PLAN DE TRABAJO	36
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
4.1. Materiales	39
4.1.1. Matriz de partida.....	39
4.1.2. Reactivos utilizados.....	39
4.2. Métodos.....	39
4.2.1. Preparación del orujo de uva Tannat	39
4.2.2. Preparación de las galletas	40

4.2.3.	Evaluación sensorial	41
4.2.3.1.	Análisis del perfil sensorial con jueces semi entrenados.....	41
4.2.3.2.	Análisis del perfil sensorial y aceptabilidad con consumidores	42
4.2.4.	Identificación de los compuestos fenólicos	42
4.2.5.	Contenido de Polifenoles Totales	43
4.2.6.	Análisis de propiedades bioactivas	44
4.2.6.1.	Capacidad antioxidante por el método ABTS	44
4.2.6.2.	Capacidad antioxidante por el método de ORAC-FL.....	45
4.2.6.3.	Capacidad antidiabética	46
4.2.6.4.	Capacidad antiobesidad	46
4.2.7.	Simulación de la digestión gastrointestinal	47
4.2.7.1.	Índice de capacidad antioxidante luego de la digestión	49
4.2.8.	Ensayos celulares	50
4.2.8.1.	Viabilidad celular	50
4.2.8.2.	Capacidad antioxidante por la inhibición de la formación de ROS intracelulares	51
4.2.8.3.	Capacidad antiinflamatoria por la inhibición de la producción de NO ..	53
4.2.8.4.	Ensayo de captación de compuestos fenólicos.....	54
4.2.9.	Ensayo de fermentación colónica <i>in vitro</i>	55
4.2.9.1.	Identificación y cuantificación de ácidos grasos de cadena corta.....	56
4.2.9.2.	Análisis de la población microbiana.....	56
4.2.10.	Análisis estadístico	57
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
	CAPÍTULO 5.1	59
5.1.1.	Desarrollo de galletas.....	61
5.1.2.	Evaluación sensorial	62
5.1.2.1.	Análisis del perfil sensorial con jueces semi entrenados.....	62
5.1.2.2.	Análisis del perfil sensorial y aceptabilidad con consumidores	64
5.1.4.	Contenido de Polifenoles Totales y propiedades bioactivas	67
5.1.4.1.	Contenido de Polifenoles Totales y capacidad antioxidante.....	67
5.1.4.2.	Capacidad antidiabética y antiobesidad	70

5.1.5. Identificación de compuestos fenólicos	74
5.1.6. Conclusión parcial	78
CAPÍTULO 5.2	80
5.2.1. Identificación de compuestos fenólicos en las Fracciones Colónicas (FC) .	82
5.2.2. Contenido de polifenoles totales en las Fracciones Bioaccesibles (FB) y Fracciones Colónicas (FC)	86
5.2.3. Análisis de propiedades bioactivas en las Fracciones Bioaccesibles (FB) y Fracciones Colónicas (FC)	88
5.2.3.1. Capacidad antioxidante por ABTS y ORAC-FL	88
5.2.3.2. Capacidad antidiabética y antiobesidad	92
5.2.4. Ensayos celulares	95
5.2.4.1. Viabilidad celular	95
5.2.4.2. Capacidad antioxidante por la inhibición de la formación de ROS intracelulares	98
5.2.4.3. Capacidad antiinflamatoria por la inhibición de la producción de NO.	102
5.2.4.4. Identificación de los compuestos fenólicos captados por las células intestinales	104
5.2.5. Ensayo de fermentación colónica <i>in vitro</i>	108
5.2.5.1. Identificación y cuantificación de ácidos grasos de cadena corta	109
5.2.5.2. Análisis de la población microbiana.....	112
5.2.6. Conclusión parcial	113
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	116
7. REFERENCIAS	120
8. ANEXO	135

ABREVIACIONES

AAPH	2,2'-Azo- bis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride
ABTS	2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
ANOVA	ANalysis Of VAriance
CACO-2	Human intestinal adenocarcinoma cell line
CATA	Check-All-That-Apply
DCFH-DA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ECNTs	Enfermedades Crónicas No Transmisibles
EPPs	Extractable Polyphenols
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FB	Fracción Bioaccesible
FBS	Fetal Bovine Serum
FC	Fracción Colónica
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GAE	Gallic Acid Equivalents
HAT	Hydrogen Atom Transfer
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPLC-DAD-MS	High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Mass Spectrometry
INAVI	Instituto Nacional de Vitivinicultura
JAR	Just About Right
LPS	Lipopolysaccharide
MTT	3-(4,5-dimethylthiazole-y)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NO	Nitric Oxide
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthases
NEPP	Non-Extractable Polyphenols
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa B
Nrf2	Nuclear Factor Erythroid 2 related factor 2
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
P/S	Penicillin-Streptomycin
RAW 264.7	Mouse macrophage cell line
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
RONS	Reactive Oxygen and Nitrogen Species
SCFAs	Short-Chain Fatty Acids

ET	Electron Transfer
TE	Trolox Equivalent
TGP	Tannat Grape Pomace
TPC	Total Polyphenol Content
TROLOX	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylch-roman- 2-acid

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Economía circular

En los últimos años, la economía circular ha ganado importante atención a nivel global como una alternativa al modelo actual de producción y consumo de la economía lineal, en el cual se extraen materias primas del medio ambiente para ser procesadas en productos finales de vida corta y desechadas al final de su vida útil. En lugar de ello, la economía circular reemplaza el concepto de "fin de vida" con la reducción, la reutilización, el reciclaje y la recuperación de materiales a lo largo de toda la cadena de producción, distribución y consumo. De esta forma, se intenta limitar el impacto en el medio ambiente y lograr un desarrollo sostenible, creando simultáneamente calidad ambiental, prosperidad económica y equidad social, en beneficio de las generaciones actuales y futuras (Fassio & Chirilli, 2023).

1.1.1. Circularidad en las industrias agroalimentarias

Dentro de la industria agroalimentaria, el concepto de economía circular ha adquirido importancia principalmente debido a la necesidad de abordar el creciente desafío de gestionar de manera adecuada los residuos agroalimentarios con repercusiones adversas tanto para el medio ambiente como para la economía (Tamasiga et al., 2022). Los residuos agroalimentarios o también llamados subproductos, son materiales que han perdido su utilidad o valor económico y se generan en actividades como la industria, la ganadería y la agricultura en etapas como la cosecha, el almacenamiento, el transporte, el procesamiento industrial, el envasado, el consumo doméstico, entre otras (Almaraz-Sánchez et al., 2022). A nivel mundial, anualmente la industria agroalimentaria produce más de 190 millones de toneladas de subproductos (Filipov et al., 2023). La conversión de estos subproductos en productos útiles se ha convertido en una estrategia clave para lograr una alta recuperación económica y reducir el impacto ambiental (Almaraz-Sánchez et al., 2022; Torres-León et al., 2018). La utilización de subproductos agroalimentarios en la creación de nuevos ingredientes y productos alimenticios, fomenta su valorización integral y los reintegra en la cadena de suministro de alimentos, en consonancia con el concepto de economía circular (Gómez-García et al., 2021). Dicha iniciativa a su vez, está alineada con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), los cuales forman parte de la agenda para el año 2030 de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y

la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés). Esta estrategia que implica la utilización sostenible de los subproductos agroalimentarios, específicamente contribuye con los objetivos número 2, 3, 12 y 13 de los ODS. El objetivo 2 se centra en "poner fin al hambre, lograr la seguridad alimentaria, mejorar la nutrición, y promover la agricultura sostenible". Por su parte, el objetivo 3 busca "garantizar una vida saludable y promover el bienestar para todos en todas las edades". El objetivo 12 busca "garantizar modalidades de consumo y producción sostenibles" y el objetivo 13 "tomar medidas urgentes para combatir el cambio climático y sus impactos" (Torres-León et al., 2018; United Nations, 2015).

En este contexto, el manejo de los subproductos generados por las industrias agroalimentarias, en particular por la industria vitivinícola, emerge como una necesidad, siendo ésta una de las principales industrias responsables de la acumulación de residuos en el mundo (Rodrigues et al., 2022).

1.2. El orujo de uva como residuo a ser valorizado

Cada vez que se procesan 1.000 kilogramos de uva para la elaboración del vino, se generan aproximadamente 200 kilogramos de residuos sólidos, por lo que anualmente la producción de vino alcanza la impresionante cifra de 20 millones de toneladas de subproductos sólidos a nivel mundial (Ferrer-Gallego, 2022; Rodrigues et al., 2022). En el año 2022, Uruguay produjo 21 millones de litros de vino tino Tannat (*Vitis vinifera cv* Tannat), lo que resultó en la generación de 6.000.000 kg de subproductos provenientes de dicha variedad (INAVI, 2022). Los subproductos sólidos generados en la producción de vino representan aproximadamente del 20 al 25% del peso inicial de las uvas (Caponio et al., 2023). Dichos subproductos se obtienen luego del prensado mecánico del mosto fermentado (siendo éste una mezcla de jugo de uva fermentado y elementos sólidos) donde se separa el jugo de los subproductos sólidos, que incluyen cáscaras, semillas y algunos restos de escobajos (Rodrigues et al., 2022; Rupasinghe et al., 2017).

El orujo de uva se destaca como el principal subproducto sólido generado por la industria vitivinícola (Balli et al., 2021). Este subproducto comprende las cáscaras de las uvas (10-12%), también conocida como epicarpio, siendo la membrana que envuelve la pulpa y

las semillas. La cáscara está formada por 6-10 capas de células aplanadas y está cubierta con una sustancia cerosa llamada pruina, que proporciona un sustrato ideal para el crecimiento de levaduras y otros microorganismos. Además, el orujo de uva incluye las semillas (3-6%), suelen ser 2 o 3 por fruto (Caponio et al., 2023; Chowdhary et al., 2021).

A nivel mundial, la disposición actual y la gestión no adecuada de los subproductos agroalimentarios han demostrado tener un impacto negativo en el medio ambiente, así como en los sectores sociales y económicos. Para evitar su acumulación y la proliferación de microorganismos y plagas, estos subproductos suelen ser simplemente desechados en vertederos o incinerados. Estas prácticas de gestión no son sostenibles ni respetuosas con el medio ambiente, siendo representadas en el extremo de la "pirámide invertida" propuesta por la FAO (**Figura 1**). La disposición en vertederos y la incineración contribuyen a la emisión de gases de efecto invernadero, que son perjudiciales para el medio ambiente. A su vez estas prácticas de gestión afectan a nivel social, ya que algunas enfermedades respiratorias pueden surgir a partir de estos contaminantes tóxicos liberados al aire, lo que disminuye la calidad de vida humana (Almaraz-Sánchez et al., 2022; Gómez-García et al., 2021). A nivel económico, el concepto de economía circular ha estado promoviendo estrategias adecuadas para gestionar y valorizar los subproductos agroalimentarios, con el fin de reducir la contaminación y promover un crecimiento sostenible de la economía entre las industrias, diseñando y creando nuevas fuentes de ingresos. Por lo tanto, tales estrategias podrían lograrse a través de una valorización integral de estos residuos biológicos de alimentos, como es el orujo de uva, que además presenta un alto contenido de compuestos que pueden considerarse beneficiosos para la salud (Antonic et al., 2020; Gómez-García et al., 2021).

La valorización del orujo de uva está experimentando una evolución reciente entre las industrias. Se ha encontrado aplicaciones en diversos campos, como la agricultura, la cosmética, la farmacia, la biorrefinería y la industria alimentaria. La incorporación del orujo de uva en alimentos presenta potencial para crear alimentos funcionales y permitir la introducción de ingredientes naturales (principalmente fibra dietaria y polifenoles) en alimentos de consumo común (Ferrer-Gallego, 2022). En la actualidad, los alimentos

funcionales se describen como alimentos con uno o más componentes específicos que tienen una influencia positiva en la salud y el bienestar del consumidor. Estos componentes pueden agregarse a los alimentos, eliminarse de los alimentos, mejorarse de forma natural mediante condiciones especiales o modificarse para proporcionar beneficios para la salud (German, 2022). Dichos alimentos ofrecen diversos beneficios para la salud humana, ayudando en la prevención o reducción del riesgo a padecer ciertas enfermedades. Por lo tanto, el utilizar los subproductos agroalimentarios como ingredientes funcionales permite aprovechar de manera eficiente recursos naturales en beneficio de la salud humana y el desarrollo sostenible (Gómez-García et al., 2021), presentando el orujo de uva gran potencial por su composición.

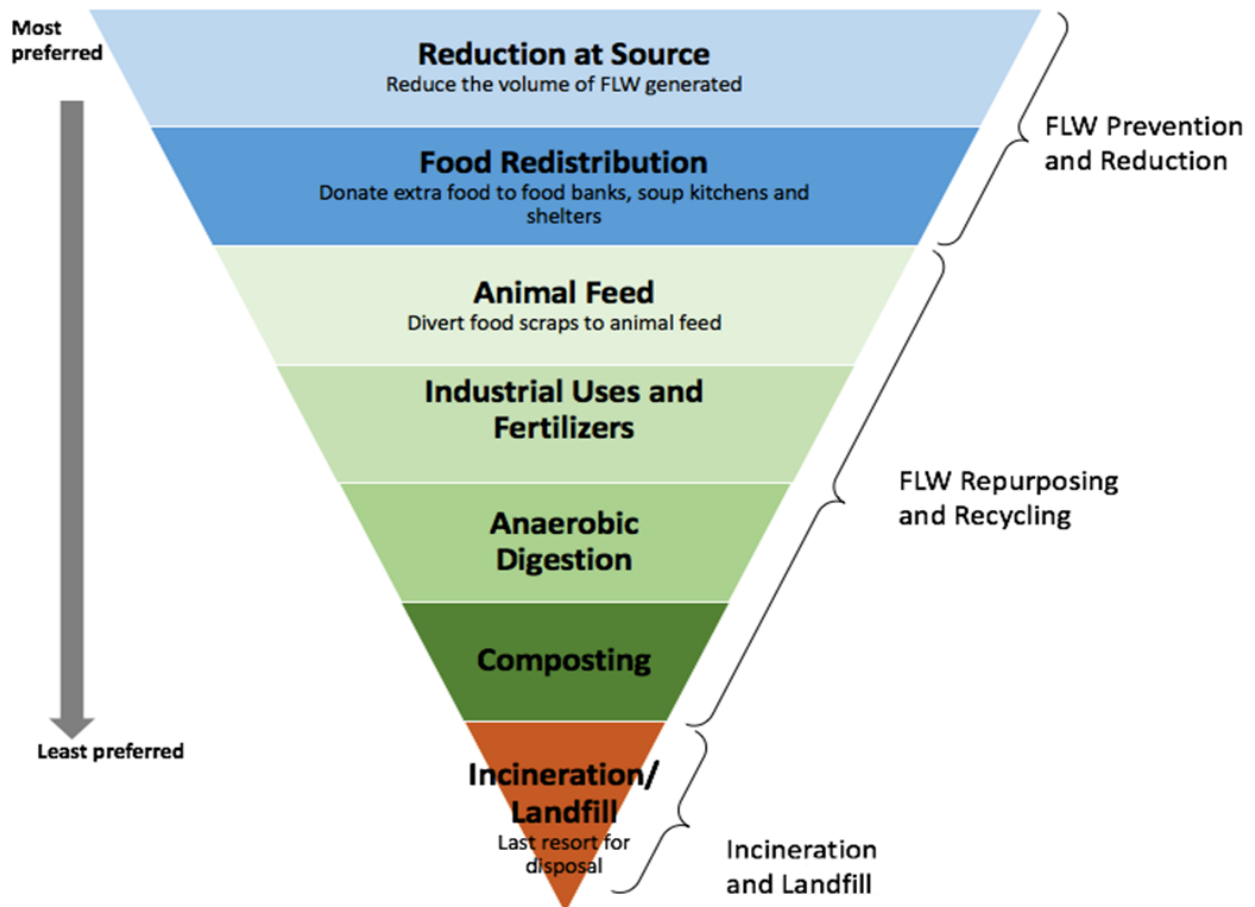


Figura 1. Pirámide invertida acerca de la gestión de los residuos agroalimentarios propuesta por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Figura extraída de Iriondo-DeHond et al. (2020). FLW: Food Losses and Waste.

1.2.1. Composición del orujo de uva

1.2.1.1. Compuestos fenólicos

El orujo de uva es una fuente rica y natural de compuestos bioactivos, siendo estos fitoquímicos biológicamente activos con potenciales beneficios para la salud. Dentro de los compuestos bioactivos, el orujo de uva es principalmente fuente de compuestos fenólicos (alrededor del 70%) que permanecen en dicho subproducto luego de la elaboración del vino (Antonic et al., 2020; Chakka & Babu, 2022). Los compuestos fenólicos, también llamados polifenoles, son productos derivados del metabolismo secundario de las plantas y cumplen en ellas roles esenciales de señalización, reproducción, crecimiento y defensa. Además de estas funciones, los polifenoles también son responsables de otorgarles ciertas propiedades organolépticas a las plantas, como son el color, el sabor y la astringencia (Núñez-Gómez et al., 2023).

Los polifenoles comprenden un número amplio de compuestos, cuyas estructuras químicas varían desde moléculas simples hasta altamente polimerizadas. La característica común en su estructura química es la presencia de uno o más grupos hidroxilo unidos a sus anillos aromático (Wojtunik-Kulesza et al., 2020; Zhang et al., 2021). Se han identificado más de 8.000 compuestos fenólicos en la naturaleza, los cuales se pueden clasificar según su origen, estructura y función biológica en dos grupos principales: flavonoides y no flavonoides. Los flavonoides son el grupo de polifenoles más grande y estudiado, con más de 4.000 tipos de compuestos identificados. Su estructura básica se compone dos radicales fenilo (anillos A y B) unidos a un anillo heterocíclico que contiene un átomo de oxígeno (anillo C) (**Figura 2**) (Chedea et al., 2022).

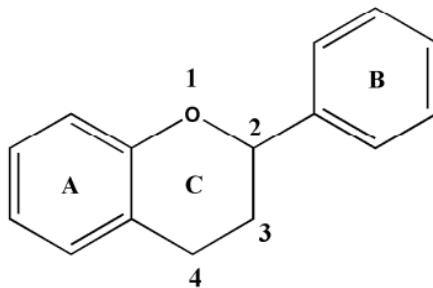


Figura 2. Estructura básica de los flavonoides. Los anillos se nombran con las letras A, B y C, siendo el anillo heterocíclico el representado con la letra C. El átomo de oxígeno está numerado

como primera posición, y los átomos de carbono restantes están numerados de C2 a C10. Figura extraída de Chedea et al. (2022).

Dependiendo de la cantidad de grupos hidroxilo, el grado de oxidación y la saturación del anillo heterocíclico con un átomo de oxígeno, los flavonoides se subdividen en varios subgrupos como se muestra en la **Figura 3** (Makarewicz et al., 2021; Núñez-Gómez et al., 2023; Rudrapal et al., 2022).

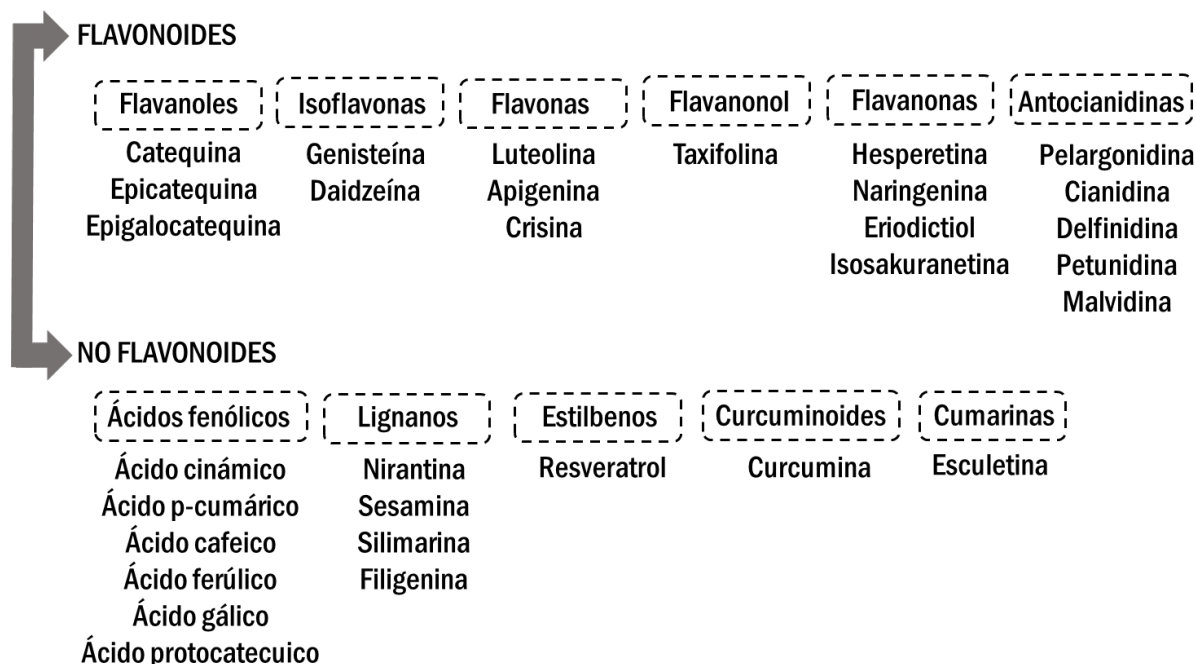


Figura 3. Representación esquemática de la clasificación de los compuestos fenólicos en flavonoides y no flavonoides, con ejemplos de compuestos pertenecientes a cada grupo. Información recopilada de Makarewicz et al. (2021); Núñez-Gómez et al. (2023); Rudrapal et al. (2022).

Es importante señalar que en su forma natural, los flavonoides suelen estar unidos a otras moléculas, principalmente azúcares, como la glucosa, la xilosa, la ramnosa o la galactosa (Núñez-Gómez et al., 2023; Rudrapal et al., 2022). Un ejemplo, son las antocianidinas que en la naturaleza por su inestabilidad se encuentran con mayor frecuencia en su forma glucosilada, pasando a denominarse antocianinas (dentro de las cuales se encuentran a la delfinidina-3-O-glucósido, la cianidina-3-O-glucósido, la petunidina-3-O-glucósido, la peonidina-3-O-glucósido y la malvidina-3-O-glucósido).

Estas antocianinas son los pigmentos que contribuyen a los colores rojos, naranjas, morados y azules de las plantas (Ku et al., 2020).

Algunos de los compuestos fenólicos pueden polimerizarse en compuestos de alto peso molecular (500–3.000 Dalton) llamados taninos, los cuales se clasifican en taninos hidrolizables o condensados según su estructura química, dependiendo de los anillos aromáticos, el número de átomos de carbono y los tipos de enlaces. Los taninos hidrolizables incluyen galotaninos y elagitaninos, que producen ácido gálico y ácido elágico, respectivamente, cuando se hidrolizan. Los taninos condensados, también se conocen como proantocianidinas, las cuales están compuestas por monómeros de catequina y epicatequina, y su grado de polimerización puede oscilar entre 3 y 11 (Rauf et al., 2019; Valencia-Hernandez et al., 2021). Las proantocianidinas se han reportado como los principales compuestos fenólicos en la semilla de uva (Yang et al., 2022). Según su grado de oxidación y patrón de sustitución se subdividen en propelargonidinas, prodelfinidinas y procianidinas. Las procianidinas están compuestas por catequina y epicatequina, mientras que las prodelfinidinas están compuestas por epigallocatequina. Al calentar en medios ácidos, las proantocianidinas generan antocianinas (Rauf et al., 2019; Valencia-Hernandez et al., 2021).

El orujo de uva de variedades tintas como Aglianico, Nero di Troia, Cabernet Sauvignon y Merlot contiene una variedad de compuestos fenólicos, incluyendo flavonoides y no flavonoides. Entre los más destacados se encuentran la malvidina-3-O-glucósido, la quercetina-3-rutinósido, la catequina, el ácido gálico y el trans-resveratrol (Caponio et al., 2023). En la cáscara del orujo de uva Tannat, se han identificado a la malvidina-3-O-glucósido y la quercetina-3-galacturonida como los principales polifenoles (Fernández-Fernández et al., 2020). Es importante tener en cuenta que el contenido y la composición de polifenoles en el orujo de uva pueden variar debido a factores fisiológicos, genéticos y agronómicos, incluyendo el cultivo, la composición del suelo, los tratamientos agronómicos, las condiciones climáticas y los tratamientos previos y posteriores a la cosecha (Núñez-Gómez et al., 2023).

Los polifenoles también se pueden clasificar según su unión a las moléculas presentes en la matriz alimentaria en polifenoles extraíbles (EPPs, por sus siglas en inglés) y polifenoles no extraíbles (NEPPs, por sus siglas en inglés) (Núñez-Gómez et al., 2023). Los EPPs son solubles en disolventes orgánicos acuosos y su liberación se logra a través de la extracción con dichos solventes. Estos compuestos se enlazan a componentes alimentarios mediante interacciones débiles e incluyen a determinados flavonoides, taninos hidrolizables, ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos. Por otro lado, los NEPPs están ligados de manera más fuerte a la matriz, persistiendo en el residuo tras la extracción y requiriendo tratamientos hidrolíticos (químicos o enzimáticos) para su liberación. Estos polifenoles luego de la masticación, del pasaje por el ambiente ácido del estómago o por la acción de enzimas digestivas no se liberan significativamente de la matriz alimentaria (Núñez-Gómez et al., 2023; Pérez-Jiménez et al., 2013). A nivel celular, una vez que los NEPPs son sintetizados, son transportados a la pared celular y luego conjugados con macromoléculas de la pared celular, como celulosa y proteínas, a través de enlaces éster y glucosídicos, contribuyendo así a la formación de la estructura de la pared celular. El complejo formado tiene implicaciones para la salud humana, ya que, debido a sus enlaces, los NEPPs pueden llegar al colon casi intactos y tras su liberación de la pared celular, si ocurre, los compuestos pueden ser utilizados por las bacterias que forman parte de la microbiota intestinal. Dentro de la categoría de los NEPPs se pueden identificar, por un lado, a los polifenoles hidrolizables, los cuales consisten en polifenoles de bajo peso molecular que se encuentran unidos a la matriz alimentaria, generalmente a la fracción de fibra presente en los alimentos. Por otro lado, se pueden identificar a las proantocianidinas no extraíbles, siendo proantocianidinas de alto peso molecular, es decir, una cadena polimérica de flavanoles que puede alcanzar varias decenas de unidades, lo que también limita su liberación de la matriz alimentaria (Das et al., 2023; Martínez-Meza et al., 2020; Núñez-Gómez et al., 2023; Plumb et al., 2020).

1.2.1.2. Fibra

Además de su contenido en polifenoles, el orujo de uva también es una fuente rica de fibra dietaria, representando hasta un 70% de su composición (Caponio et al., 2023; Chakka & Babu, 2022). La fibra dietaria se define como las "partes comestibles de las

plantas que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado humano, con fermentación completa o parcial en el intestino grueso” (Caponio et al., 2023). La misma consiste de polisacáridos resistentes con un mínimo de 10 unidades monoméricas, oligosacáridos resistentes que contienen entre 3 y 9 unidades monoméricas y lignina que, aunque no es un polisacárido, también forma parte de la fibra dietaria (Debnath et al., 2019; Myhrstad et al., 2020; Veronese et al., 2018). Los polisacáridos resistentes que forman parte de la fibra, se clasifican en polisacáridos no amiláceos y almidón resistente (Myhrstad et al., 2020). Dentro de los polisacáridos no amiláceos, los principales compuestos encontrados son la hemicelulosa, la celulosa, las pectinas y las gomas (Debnath et al., 2019).

Dentro de las categorías para clasificar a la fibra dietaria, se consideran factores como su capacidad para dispersarse completamente al mezclarse con agua, clasificándose en fibra soluble e insoluble. A su vez, se puede clasificar según su viscosidad y su capacidad para ser fermentada particularmente (pero no solo) en el intestino grueso (Myhrstad et al., 2020; Williams et al., 2019). Algunos polisacáridos no amiláceos exhiben alta solubilidad, viscosidad y fermentabilidad, mientras que otros carecen de estas propiedades. El almidón resistente se considera no soluble, poco viscoso y parcialmente fermentable. Por otro lado, los oligosacáridos resistentes se caracterizan por ser altamente solubles y fermentables, aunque menos viscosos en comparación con los polisacáridos resistentes. La fibra soluble e insoluble suele fermentarse por la microbiota intestinal produciendo ácidos orgánicos de cadena corta (SCFAs, por sus siglas en inglés), principalmente ácido acético, propiónico y butírico (Das et al., 2023; Myhrstad et al., 2020).

Acerca de la fibra dietaria en el orujo de uva, se ha reportado que en la cáscara del orujo de uva Tannat representa aproximadamente el 47% de su composición total (Fernández-Fernández et al., 2019), mientras que en el orujo de uva de la misma variedad es de aproximadamente 64% (Olt et al., 2023), indicando que la semilla también contribuye significativamente al contenido de fibra dietética. Adicionalmente, en el estudio de Meini et al. (2021) se reportó un 42% de fibra detergente neutra de su composición total para la variedad de orujo de uva Tannat.

La fibra dietaria presente en el orujo de uva se caracteriza por tener una proporción significativa de fibra insoluble en comparación con la fibra soluble y un bajo contenido calórico (Caponio et al., 2023; Chakka & Babu, 2022). La fibra dietaria insoluble en el orujo de uva representa entre el 26% y el 78% e incluye componentes como la celulosa y la hemicelulosa. Por otro lado, la fibra dietaria soluble, como las pectinas, los β -glucanos, las gomas, las mucílagos, los oligosacáridos o la inulina, representa aproximadamente el 9-11% del contenido total de fibra en el orujo de uva (Chakka & Babu, 2022; Quirós-Sauceda et al., 2014). Ya han sido varios los alimentos que presentaron mayor contenido de fibra dietaria al ser enriquecidos con orujo de uva de diversas variedades, siendo tallarines (Balli et al., 2021) y muffins (Troilo et al., 2022) ejemplos de ellos.

La evidencia epidemiológica ha demostrado de manera consistente que un mayor consumo de fibra dietaria se asocia con un menor riesgo de padecer varias enfermedades crónicas. Se han propuesto muchos posibles mecanismos a través de los cuales la fibra puede actuar, incluyendo principalmente la reducción de la absorción de glucosa y reducción de niveles de la lipoproteínas de baja densidad, así como el efecto de saciedad que puede promover la pérdida de peso (Veronese et al., 2018). La fibra dietaria ha sido encontrada en asociación con compuestos fenólicos, fusionando ambos efectos fisiológicos en un solo producto (Eskicioglu et al., 2015; Quirós-Sauceda et al., 2014).

1.2.1.3. Fibra antioxidante

El complejo de "fibra dietaria antioxidante" fue definido por Saura-Calixto (1998) como una fibra dietaria rica en compuestos fenólicos asociados. Los principales compuestos fenólicos de la fibra dietaria antioxidante son los previamente descritos como NEPPs. Los anillos aromáticos de estos compuestos presentan grupos hidrofílicos que pueden unirse a polisacáridos o proteínas de la pared celular. Las interacciones más frecuentes entre las proteínas y los polifenoles son enlaces hidrofóbicos y/o enlaces de hidrógeno, así como entre carbohidratos y polifenoles que aumentan con el grado de polimerización (Núñez-Gómez et al., 2023). El orujo de uva se ha reportado como una fuente de fibra

dietaria antioxidante, con un alto contenido de proantocianidinas no extraíbles (Pérez-Jiménez et al., 2013).

Por otro lado, el orujo de uva presenta otros compuestos con potencial efecto biológico que se encuentran en menor proporción (Caponio et al., 2023).

1.2.1.4. Componentes minoritarios

Además de los componentes mencionados anteriormente, el orujo de uva de variedades tintas también se ha identificado como fuentes de otros componentes minoritarios. El orujo de uva proveniente de la variedad de uva tinta Cabernet Sauvignon mostró un contenido de lípidos del 6%, un contenido de minerales del 7% y un contenido de proteínas del 12% de su composición total (F. Zhu et al., 2015). Por otro lado, el orujo de uva Tannat ha sido identificado como una fuente de lípidos (9%), minerales (7%) (Olt et al., 2023) y proteínas (11 - 13%) (Meini et al., 2021; Olt et al., 2023). Si bien, hasta donde llega nuestro conocimiento no hay información sobre la composición específica en minerales de dicha variedad, se ha detectado la presencia de varios minerales en el orujo de otras variedades de uvas tintas, como Ca (9,90 g/kg), P (2,70 g/kg), Mg (0,80 g/kg), K (13,90 g/kg), Na (0,22 g/kg), S (1,50 g/kg), Mn (13,00 mg/kg), Zn (25,00 mg/kg) y Cu (49,00 mg/kg) (Spinei & Oroian, 2021). A su vez el orujo de uva tinta dentro de sus componentes minoritarios también presenta tocoferoles (265-454 mg/kg), β -carotenos, ácido ascórbico, siendo estas moléculas con un alto poder antioxidante que se encuentran principalmente en las semillas del orujo de uva. A su vez, en la semilla se encuentran fitoesteroles los cuales desempeñan un papel importante en la salud cardiovascular al reducir la absorción del colesterol a nivel intestinal, lo que resulta en un aumento en la excreción de colesterol a través de las heces y en consecuencia una reducción significativa en las concentraciones sanguíneas (Caponio et al., 2023; Spinei & Oroian, 2021).

1.2.2. Beneficios saludables del orujo de uva

El consumo de orujo de uva, principalmente por su contenido en compuestos fenólicos y fibra dietaria puede ofrecer importantes beneficios para la salud del consumidor, incluyendo la prevención y el tratamiento de Enfermedades Crónicas No Transmisibles (ECNTs), como son la diabetes, las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades

respiratorias y el cáncer. Estas enfermedades comparten factores de riesgo en común, como dietas poco saludables, inactividad física, consumo de tabaco y consumo excesivo de alcohol. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), dichas enfermedades son responsables de una parte significativa de la mortalidad global, causando aproximadamente 41 millones de muertes cada año (74%) (Núñez-Gómez et al., 2023; World Health Organization, 2023). Los esfuerzos destinados a abordar y prevenir las ECNTs se han convertido en una prioridad global de suma importancia. Estas enfermedades representan una carga significativa para los sistemas de atención médica y las economías en todo el mundo. Las intervenciones en el estilo de vida constituyen una de las estrategias fundamentales para reducir el impacto de las ECNTs y mejorar la salud general de la población (World Health Organization, 2023).

Las ECNTs a menudo son consecuencia del estrés oxidativo. En concentraciones fisiológicas, las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RONS, por sus siglas en inglés), las cuales incluyen al superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\cdot OH$), peroxinitrito (ONO_2^-), y óxido nítrico (NO) pueden actuar como moléculas señalizadoras en vías de señalización redox y tienen funciones esenciales que incluyen el metabolismo celular, la expresión génica, la progresión del ciclo celular, la supervivencia celular, la proliferación y diferenciación celular, la organización del citoesqueleto, la defensa inmunológica, la angiogénesis y la relajación vascular, entre otros. Sin embargo, cuando se genera un desequilibrio entre la producción/acumulación de RONS y el sistema de defensa antioxidante se genera un fenómeno conocido como estrés oxidativo (Fernández-Fernández, Dellacassa, Medrano-Fernandez, et al., 2021; Sakundeck et al., 2020) donde dichas moléculas reactivas actúan como inductoras de daño celular causando diversas enfermedades. Se ha demostrado que ciertos compuestos presentes en el orujo de uva, como son los compuestos fenólicos, pueden actuar en la modulación del estado redox celular (Gerardi et al., 2022). Dichos compuestos, exhiben propiedades bioactivas, las cuales se detallan a continuación, y pueden desempeñar un papel crucial en la prevención y/o tratamiento de las ECNTs.

1.2.2.1. Capacidad antioxidante

Una de las propiedades más conocidas de los polifenoles es su actividad antioxidante (Dini & Grumetto, 2022). Un antioxidante se define como molécula que es capaz de prevenir, reducir, o inhibir la oxidación de otras moléculas. Los antioxidantes se pueden clasificar de diversas maneras, como naturales o sintéticos, polares o no polares, enzimáticos o no enzimáticos, endógenos o exógenos, y según su mecanismo de acción, que puede ser tanto directa como indirecta (Kotha et al., 2022).

El mecanismo directo implica la formación de complejos estables con metales de transición como es el Fe^{2+} , evitando así la formación de radicales libres. En la reacción de Fenton, donde el Fe^{2+} reacciona con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), se genera el radical hidroxilo ($HO\cdot$), una molécula altamente reactiva que puede iniciar la oxidación de otras moléculas (Bié et al., 2023). El mecanismo directo también implica la reacción de los antioxidantes con RONS para generar productos menos reactivos. La efectividad de esta actividad directa se atribuye a la presencia de grupos hidroxilo en el anillo bencénico. Estos grupos hidroxilo actúan mediante varios mecanismos, que incluyen la Transferencia de Átomo de Hidrógeno (HAT, por sus siglas en inglés) y la Transferencia de Electrones (ET, por sus siglas en inglés) estabilizando así las especies reactivas y en consecuencia prevenir el daño celular y el subsiguiente riesgo de padecer ECNTs (Gerardi et al., 2022; Pisoschi & Pop, 2015; Wojtunik-Kulesza et al., 2020).

A su vez, los antioxidantes pueden ejercer también mecanismos indirectos mediante la activación del sistema antioxidante endógeno (Gerardi et al., 2022). Los antioxidantes endógenos son principalmente enzimas, como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión reductasa (GR) y la glutatión peroxidasa (GPx) que convierten los ROS en moléculas no reactivas. También existen antioxidantes endógenos no enzimáticos, como el glutatión y el ácido lipoico, los cuales son productos del metabolismo del cuerpo que pueden actuar como una defensa de segunda línea inactivando rápidamente radicales y oxidantes (Kotha et al., 2022).

En este contexto, los polifenoles desempeñan un papel crucial como antioxidantes mediante diversos mecanismos. En primer lugar, participan directamente en la donación

de electrones (ET) y en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) a los RONS (Gerardi et al., 2022). Específicamente, se ha informado que un extracto derivado de la cáscara del orujo de uva Tannat presenta actividad antioxidante mediante un mecanismo de acción directo mostrando actividad mediante el ensayo de ABTS (implica el mecanismo de acción ET), así como en el ensayo de ORAC-FL (implica el mecanismo de acción HAT) (Fernández-Fernández et al., 2019). Aunque estas reacciones pueden generar un radical derivado del compuesto fenólico, la ventaja radica en que, gracias a los anillos aromáticos conjugados, el electrón desapareado comienza a deslocalizarse en toda la estructura. La resonancia hace que el radical derivado del compuesto fenólico sea relativamente estable, evitando así la iniciación de nuevas reacciones en cadena y actuando como un terminador de la ruta de propagación al reaccionar con otros radicales libres (Dini & Grumetto, 2022; Gerardi et al., 2022). Adicionalmente, los polifenoles pueden actuar como antioxidantes indirectos al regular factores de transcripción como lo es el factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2). La activación de Nrf2 desencadena una respuesta a nivel genético, estimulando la expresión de genes relacionados con enzimas antioxidantes como las previamente mencionadas. La concentración del Nrf2 ha mostrado ser más alta en peces suplementados con dosis elevadas de orujo de uva (200, 300 mg) en comparación con dosis bajas (100 mg) o en peces sin suplementar (Chedea et al., 2022). Así, los polifenoles presentes en el orujo de uva presentan capacidad para contrarrestar el estrés oxidativo y proteger las células y tejidos contra el daño oxidativo (Dini & Grumetto, 2022; Gerardi et al., 2022). Además de la capacidad antioxidante, los polifenoles se han reportado como compuestos con potencial para controlar la diabetes (Naz et al., 2023).

1.2.2.2. Capacidad antidiabética

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico crónico causado por una disminución en la concentración de insulina en sangre, generando una condición hiperglucémica (niveles elevados de glucosa en la sangre) (Dwibedi et al., 2022). Los niveles elevados a largo plazo de glucosa en sangre se asocia con complicaciones macro y microvasculares que provocan enfermedades cardíacas, accidentes cerebrovasculares, ceguera, enfermedades

renales, entre otras (Asmat et al., 2016). La enfermedad se clasifica principalmente en 2 tipos, diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2, siendo la segunda el tipo más común de diabetes en la cual la hiperglucemia se debe principalmente a la resistencia a la insulina y a una reducción en la producción de dicha hormona (Cisneros-Yupanqui et al., 2023). Se estima que para el año 2030 habrá más de 300 millones de casos de diabetes tipo 2 (Naz et al., 2023). Una manera de controlar la diabetes tipo 2, es regular los niveles de glucosa en sangre a través del uso de medicamentos antidiabéticos orales, como los inhibidores de enzimas digestivas de carbohidratos con un enfoque principal en la inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa (Cisneros-Yupanqui et al., 2023). Estas enzimas son responsables de hidrolizar los oligosacáridos y disacáridos en monosacáridos fácilmente absorbibles (Dwibedi et al., 2022). Actualmente, se han desarrollado inhibidores sintéticos de enzimas digestivas de carbohidratos. No obstante, estos no están exentos de efectos secundarios, por lo que la búsqueda de inhibidores más específicos y mejor tolerados, con efectos adversos limitados, se encuentra como un importante objetivo de investigación. Se ha informado que algunos extractos de plantas son capaces de controlar la diabetes tipo 2 al inhibir enzimas digestivas, incluso de manera más fuerte que los medicamentos comerciales. Los compuestos fenólicos han sido reconocidos por presentar actividad antidiabética relacionada principalmente con su capacidad para reducir los niveles de glucosa posprandiales, especialmente a través de la inhibición de enzimas digestivas humanas al unirse a los sitios activos (lo que las vuelve inactivas) o los sustratos para que no puedan ser hidrolizados por las mismas. Dentro de ellos, los extractos naturales, especialmente los ricos en proantocianidinas, han demostrado la capacidad de inhibir la α -amilasa y la α -glucosidasa intestinal, constituyendo potencialmente una alternativa a los inhibidores sintéticos. Como fue mencionado anteriormente, las procianidinas presentes en las semillas de uva son polímeros de flavanoles, que están formados exclusivamente por unidades de catequina y/o epicatequina. Las procianidinas tienen más sitios de interacción potenciales que los compuestos fenólicos monoméricos, por lo que pueden entrelazarse fácilmente con diferentes moléculas, por ejemplo enzimas (Cisneros-Yupanqui et al., 2023). Ya se ha reportado la capacidad de un extracto de orujo de uva Tannat para inhibir con una mayor

eficiencia a la α -glucosidasa en comparación con el inhibidor sintético comercial, la acarbosa. Además, se ha informado de una alta correlación lineal entre el contenido de flavanoles en los extractos de semillas y cáscaras de orujo de uva Tannat en relación con la inhibición de la α -glucosidasa (Dudoit et al., 2020).

Así como los compuestos fenólicos muestran la capacidad de prevenir la diabetes al regular la actividad de la α -glucosidasa, también poseen la capacidad de inhibir enzimas relacionadas con la obesidad (Unusan, 2020).

1.2.2.3. Capacidad antiobesidad

El sobrepeso y la obesidad se han convertido en un importante problema de salud pública debido principalmente a su fuerte vínculo con el desarrollo de diversas ECNTs. Las estimaciones globales recientes indican que más del 51% de la población mundial vivirá con sobrepeso (27%) u obesidad (24%) para 2035 (Diet et al., 2023; Walker & Littlewood, 2023). Abordar la problemática de esta enfermedad involucra la implementación de múltiples estrategias, entre las cuales se destaca la regulación de los niveles circulantes de triglicéridos, que son los principales depósitos de grasa en el organismo. La lipasa pancreática desempeña un papel crucial en la absorción de los triglicéridos, ya que los hidroliza, liberando ácidos grasos que pueden ser absorbidos, lo que tiene una estrecha relación con el control del peso corporal y la obesidad. Por lo tanto, el uso de compuestos que inhiban dicha enzima representa una estrategia de gran potencial para la regulación de trastornos metabólicos relacionados con la obesidad (Diet et al., 2023; Ferreira et al., 2020). En el contexto de la obesidad, se ha demostrado que un consumo regular de orujo de uva, gracias a su composición en polifenoles, puede ayudar a reducir la acumulación de grasa corporal y prevenir dicha patología (Yang et al., 2023). Dicho efecto podría estar relacionado con la capacidad ya reportada de extractos de semillas (Carullo et al., 2020) y cáscara de uva (Fernández-Fernández et al., 2019) para inhibir a la lipasa pancreática. Algunos autores han atribuido los efectos beneficiosos del orujo uva a las proantocianidinas, que mostraron generar una disminución del peso corporal y del peso relativo del tejido adiposo blanco, así como una mejora en el metabolismo lipídico y el estado inflamatorio (Diet et al., 2023). En modelos de ratones

obesos que fueron suplementados con un extracto comercial de semilla de uva enriquecido con dímeros de procianidina, se observó una inhibición en la acumulación de grasa, la cual estuvo asociada con una disminución de los niveles plasmáticos de triglicéridos, en comparación con ratones obesos alimentados con una dieta estándar sin suplementación (Leonetti et al., 2018).

La obesidad está estrechamente vinculada con la inflamación, ya que en dicha patología se activan vías inflamatorias y liberan moléculas proinflamatorias, creando un estado de inflamación crónica (Khanna et al., 2022).

1.2.2.4. Capacidad antiinflamatoria

La inflamación es un mecanismo de defensa vital para la salud y es la respuesta del sistema inmune a estímulos dañinos en el organismo, como son los patógenos, los compuestos tóxicos, la irradiación y los componentes asociados al daño celular (Chen et al., 2018). Durante el proceso inflamatorio, los macrófagos activados, células clave del sistema inmune, generan cantidades significativas de factores inflamatorios, entre ellos el óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés) para ayudar a combatir la infección (Sales et al., 2023). Si bien el NO desempeña funciones cruciales en diversas respuestas fisiológicas, un desequilibrio en su producción y su acumulación excesiva puede contribuir a procesos patológicos y al desarrollo de enfermedades, como el accidente cerebrovascular, la inflamación crónica y la hipertensión. A pesar de que la vida media del NO es solo de unos pocos segundos, esta molécula es altamente reactiva y actúa como precursora de las especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés). Estas RNS se caracterizan por su alta reactividad química debido a la presencia de electrones desapareados en su estructura. La producción excesiva de estas RNS puede dar lugar a un fenómeno similar al estrés oxidativo, conocido como estrés nitrosativo, el cual representa un estado de desequilibrio entre la cantidad de RNS formados y la capacidad endógena para neutralizar estas especies reactivas. El estrés nitrosativo, al igual que el estrés oxidativo, puede causar daño a proteínas, lípidos e incluso al ADN, lo que puede inducir la apoptosis y en situaciones más intensas de estrés nitrosativo, se puede producir necrosis (Kr & Kepinska, 2021; Serreli & Deiana, 2023).

La síntesis del NO tiene lugar a través de una reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS, por sus siglas en inglés) utilizando la arginina como sustrato. Esta enzima, tiene tres isoformas: óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Estas isoformas son relativamente específicas para los tejidos humanos y se activan o expresan como respuesta a estímulos fisiológicos y patológicos. nNOS y eNOS también son reconocidas como isoformas constitutivas, a diferencia de iNOS, que no se expresa de manera continua en los tejidos. La expresión de la iNOS se induce por estímulos extracelulares en casi todos los tipos de células y genera niveles elevados de NO en el entorno circundante durante períodos prolongados. Se expresa principalmente en macrófagos, neutrófilos y células epiteliales, y su actividad depende de la disponibilidad de arginina, por lo que sus funciones están reguladas por el transporte o consumo de arginina a través de otras vías bioquímicas (Serreli & Deiana, 2023). La cuantificación de la producción de NO por macrófagos se considera una herramienta para evaluar propiedades antiinflamatorias (Sales et al., 2023). Controlar la actividad de la producción de NO representa una prometedora estrategia para el tratamiento de enfermedades asociadas con su producción excesiva. En el caso de la diabetes tipo 2, los macrófagos son actores importantes en el contexto inflamatorio crónico típico de dicha patología (Chen et al., 2018) por lo que, la disminución de la producción de NO podría ayudar al control de dicho contexto.

En este contexto, se ha informado sobre la capacidad de los compuestos fenólicos, como los presentes en el orujo de uva, para modular los niveles de la NOS mediante la activación de ciertos genes (Bocsan et al., 2022). Se ha informado que un extracto de orujo de uva tinta (*Vitis vinifera* L., cv Negramaro) mejora la respuesta inflamatoria en las células intestinales al regular la expresión de genes cruciales involucrados en el proceso oxidativo e inflamatorio asociado a la enfermedad inflamatoria intestinal (Calabriso et al., 2022). Adicionalmente, se ha informado la disminución de la producción de NO por parte de los macrófagos en condiciones de inflamación. Un extracto hidroalcohólico ácido obtenido de la cáscara de orujo de uva Tannat mostró una mayor

capacidad para reducir la producción de NO por macrófagos en comparación con las células que no fueron tratadas con dicho extracto (Fernández-Fernández et al., 2019).

Los polifenoles, además de sus efectos antiinflamatorios han demostrado presentar capacidad prebiótica, al estimular el crecimiento de bacterias beneficiosas en el intestino (Silva et al., 2020; Williamson & Clifford, 2010).

1.2.2.5. Capacidad prebiótica

Recientemente, se ha redefinido el concepto de prebióticos, describiéndolos como sustratos selectivamente utilizados por los microorganismos presentes en el hospedero, con la capacidad de conferir beneficios para la salud. Esta definición abarca tanto carbohidratos como sustancias no carbohidratos que exhiben efectos saludables en diferentes sitios del organismo (Bengoa et al., 2020; Davani-Davari et al., 2019). Si bien los fructo-oligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos (GOS) y trans-galacto-oligosacáridos (TOS) son los prebióticos más comunes (Davani-Davari et al., 2019), recientemente se ha informado sobre la utilización de compuestos fenólicos como prebióticos en el desarrollo de alimentos funcionales (Meini et al., 2021). El consumo de prebióticos se ha revelado como una estrategia prometedora para reducir el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas asociadas a la disbiosis, tales como la enfermedad inflamatoria intestinal, el síndrome del intestino irritable y la diabetes tipo 1 (Bengoa et al., 2020; Davani-Davari et al., 2019).

Los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs, por sus siglas en inglés) son los principales compuestos generados en la fermentación de la fibra dietaria por la microbiota intestinal (Bengoa et al., 2020), son ácidos orgánicos cuya cadena de carbono consta de menos de seis átomos de carbono. Entre ellos se encuentran el ácido acético, propiónico y butírico. Se estima que el ácido acético contribuye aproximadamente al 60% del total de SCFAs, mientras que el ácido propiónico y el butírico representan cada uno un 20% (Fusco et al., 2023). A su vez, existen otros productos derivados de la fermentación de los prebióticos, en los que se incluye ácido láctico, hidrógeno, metano y dióxido de carbono (Bengoa et al., 2020). Los SCFAs son moléculas suficientemente pequeñas como para difundirse a través de los enterocitos intestinales y entrar en la circulación sanguínea. Por

lo tanto los prebióticos pueden impactar positivamente no solo en el tracto gastrointestinal, sino también en otros órganos y sistemas distantes (Davani-Davari et al., 2019). Los SCFAs se transportan al sistema circulatorio y pueden afectar directamente al metabolismo del hospedero al unirse a los receptores acoplados a proteínas G los cuales se expresan en varios tejidos metabólicamente activos y están involucrados en respuestas y regulación de diversos procesos, como la homeostasis de la glucosa y el metabolismo de los lípidos. También existe evidencia que sugiere que los SCFAs pueden actuar como inhibidores de las histonas deacetilasas, lo que modula la expresión génica. Además, los SCFAs son fuente importante de energía para las células epiteliales intestinales y contribuyen a fortalecer la función de barrera intestinal (Myhrstad et al., 2020).

En este contexto, se ha estudiado el orujo de uva tanto la variedad Tannat como la Malbec, por sus características prebióticas (Meini et al., 2021). La suplementación en ratones con un extracto etanólico de orujo de uva tinta comercial demostró cambios en la composición de la microbiota intestinal, particularmente una disminución en los géneros que se han informado previamente que influyen en enfermedades metabólicas (Van Hul et al., 2017). Las proantocianidinas se han reportado como polifenoles complejos no absorbibles con capacidad de ejercer efectos prebióticos (Das et al., 2023). Además, se estudió el efecto prebiótico de los polifenoles de orujo de uva tinta en combinación con la bacteria probiótica *Lactiplantibacillus sp.* por sus propiedades antiinflamatorias, haciendo hincapié en una acción sinérgica entre los prebióticos y los probióticos (Caponio et al., 2023).

El orujo de uva tinta, gracias a las propiedades bioactivas anteriormente descritas, con potencial para aportar beneficios para la salud, se presenta como un potencial ingrediente para ser utilizado en la formulación de alimentos funcionales.

1.2.3. Uso de orujo de uva en la formulación de alimentos y sus desafíos

El orujo de uva tinta se ha empleado para enriquecer una variedad de productos alimentarios, incluyendo pan, pasta, muffins, galletas, fideos, panqueques, así como aguas e infusiones. También ha sido utilizado con éxito en la fortificación de productos cárnicos y de pescado, como hamburguesas y salchichas de cerdo, de pollo y de salmón.

Dicha fortificación se ha utilizado para mejorar el potencial bioactivo y las propiedades físicas de alimentos (Antonic et al., 2020; Ferrer-Gallego, 2022). No obstante, en el desarrollo de nuevos alimentos funcionales, es fundamental abordar diversos desafíos, siendo la evaluación de las propiedades sensoriales uno de los aspectos más destacados. Para lograr el éxito en el lanzamiento de un nuevo producto, es esencial implementar estrategias que incluyan una evaluación sensorial adecuada, junto con una comprensión detallada de los criterios de aceptación por parte de los consumidores. Además, es fundamental definir con precisión el público objetivo lo cual desempeña un papel clave en el éxito en el mercado (Guin et al., 2020). En este contexto, varios estudios han incluido el análisis sensorial en productos desarrollados con orujo de uva (Antonic et al., 2020). Cabe destacar que muchos de dichos alimentos dulces elaborados con orujo de uva, suelen incluir en la formulación el uso de edulcorantes (Hussain et al., 2018; Karp et al., 2016). Esto se debe principalmente a las tendencias emergentes en la industria alimentaria que buscan ofrecer productos bajos en calorías ofreciendo beneficios para la salud del consumidor (Karp et al., 2016).

Continuando con las etapas en el desarrollo de alimentos funcionales, además de la evaluación sensorial, es importante la determinación del impacto del procesamiento sobre el alimento. Ciertos métodos de procesamiento, como los que involucran tratamientos térmicos, pueden desencadenar reacciones químicas no deseadas en los alimentos, lo que resulta en la generación de compuestos tóxicos y la pérdida de nutrientes específicos. Se ha observado que esto puede afectar tanto el contenido total de compuestos fenólicos como el perfil fenólico de los alimentos vegetales. La influencia de este proceso puede variar según la técnica de cocción utilizada, el tiempo y la temperatura de cocción, el tipo de alimento y la estructura química de los compuestos fenólicos del alimento (Martini et al., 2021).

La cocción no solo influye en el contenido y perfil fenólico de los alimentos, sino que también puede afectar la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos presentes. Por lo tanto, para avanzar en el desarrollo de alimentos funcionales, es crucial llevar a cabo estudios de bioaccesibilidad y biodisponibilidad, comenzando por los

estudios de bioaccesibilidad. Éstos implican una simulación *in vitro* de la digestión oral-gastrointestinal, que permite verificar las propiedades bioactivas de los compuestos después de la digestión (Ghazanfar et al., 2022; Pinto et al., 2023).

1.3. Proceso de digestión gastrointestinal

Aunque la incorporación de orujo de uva en alimentos puede potenciar sus propiedades bioactivas, es crucial que estos compuestos no solo resistan al procesamiento del alimento al cual fueron incorporados, sino que también deben soportar el proceso de digestión. Es esencial que se liberen de la matriz alimentaria y permanezcan estables en el tracto gastrointestinal. Posteriormente, estos compuestos deben someterse al metabolismo y, finalmente, llegar al sitio diana donde pueden ejercer sus efectos beneficiosos en la salud (Gerardi et al., 2022; Sensoy, 2021). La forma en que los compuestos bioactivos se liberan durante el proceso de digestión depende de los procesos mecánicos y químicos involucrados, así como del tipo de alimento ingerido (Wojtunik-Kulesza et al., 2020). Es en este contexto donde se introducen los conceptos de bioaccesibilidad y biodisponibilidad.

La bioaccesibilidad se define como la cantidad de un compuesto específico solubilizado en el intestino delgado y disponible para su posterior absorción (Helal & Agliazucch, 2018). La bioaccesibilidad varía de un compuesto a otro, incluso dentro de la misma familia, debido a la influencia de la estructura química y la forma en que se encuentra interaccionando con los compuestos en la matriz del alimento (Ferreyra et al., 2021; Gerardi et al., 2022). Este punto es crucial, ya que los compuestos liberados de la matriz alimentaria y estables en las condiciones gastrointestinales son compuestos potencialmente biodisponibles y están en condiciones de ejercer sus efectos beneficiosos en el tracto gastrointestinal (Helal & Agliazucch, 2018). Por lo tanto, para que un compuesto bioactivo pueda producir un efecto biológico en su sitio diana debe estar biodisponible, lo que se refiere a la velocidad y la medida en que el compuesto bioactivo se absorbe desde el intestino e ingresa en la circulación sistémica para ejercer su actividad biológica (Ed Nignpense et al., 2021; Gerardi et al., 2022). Para determinar la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos, se puede llevar a cabo una simulación

digestiva *in vitro* realizando tres etapas de la digestión: oral, gástrica e intestinal (duodeno) (Brodkorb et al., 2019).

1.3.1. Etapas del proceso de digestión gastrointestinal

La digestión ocurre en el tracto digestivo (**Figura 4**), un sistema abierto con una longitud total de aproximadamente 8-9 metros. Este proceso comienza en la boca y continúa a través de la faringe, el esófago, el estómago, el intestino delgado que se subdivide en duodeno, yeyuno e íleon. Luego, continúa por el intestino grueso, que incluye el ciego, colon ascendente, colon transverso, colon descendente y colon sigmoide, culminando en el recto y finalizando en el ano, lugar por el cual se excretan entre otras cosas, los componentes no absorbidos. Órganos accesorios como las glándulas salivales, el hígado, el páncreas y la vesícula biliar desempeñan roles esenciales en este proceso (Sensoy, 2021; Wojtunik-Kulesza et al., 2020).

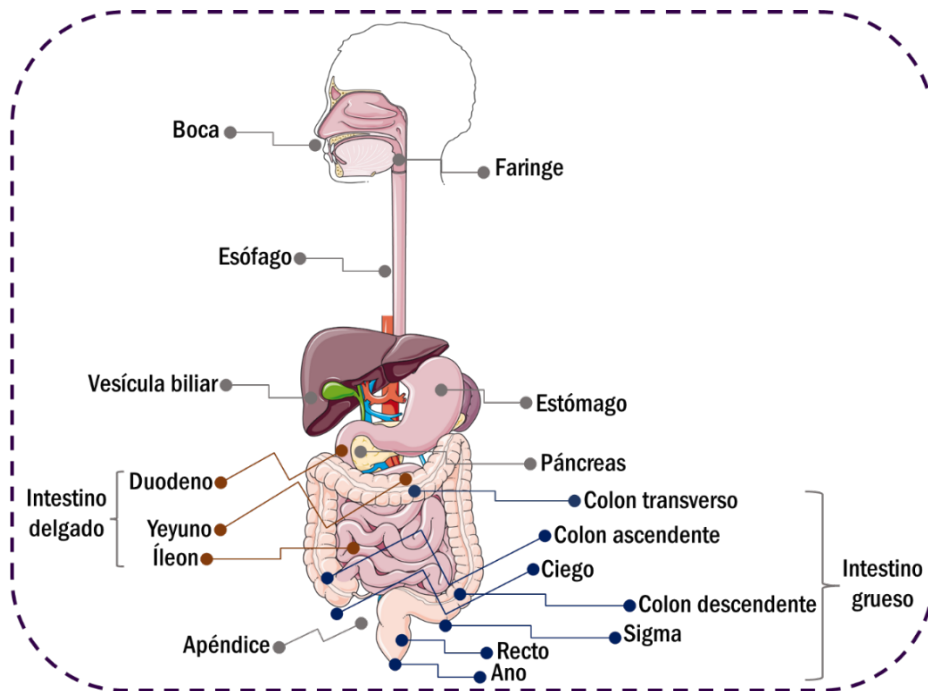


Figura 4. Esquema del aparato digestivo.

El proceso de digestión comienza en la boca, donde la saliva (compuesta de H_2O , Na, K, Ca, HCO_3 , mucina, α -amilasa y lipasa lingual) secretada por las glándulas salivales, desempeña un papel crucial al humedecer y comenzar a descomponer el alimento. En esta etapa, la α -amilasa convierte el almidón en moléculas de maltosa, mientras que la

lipasa lingual hidroliza los enlaces éster en los triglicéridos para formar diacilgliceroles y monoacilgliceroles. El bolo alimenticio resultante se impulsa desde la boca al esófago, donde las contracciones peristálticas lo transportan al estómago (Patricia & Dhamoon, 2022; Sensoy, 2021).

El estómago, revestido internamente con mucosa gástrica, secreta jugo gástrico (compuesto por H₂O, HCl, electrolitos, mucus, enzimas (lipasa y pepsinógeno) y hormonas (gastrina, serotonina)). La mucosa gástrica contiene diversidad de células, entre ellas células epiteliales, células mucoides (secretan moco gástrico), células principales (secretan lipasa gástrica y pepsinógeno), células de gastrina (secretan la hormona gastrina como respuesta a la ingesta de comida), células parietales y otras células endócrinas. La hormona gastrina, al unirse a los sitios receptores de las células parietales, desencadena la producción de iones de hidrógeno, los cuales forman ácido clorhídrico (HCl) al combinarse con iones cloruro. La acidez estomacal activa el pepsinógeno, que es convertido en su forma activa (pepsina) iniciando la digestión de proteínas a péptidos y/o aminoácidos. Una fracción reducida de los triglicéridos presentes en la dieta también experimenta la acción de la lipasa preduodenal en el estómago, dando lugar a la formación de partículas de emulsión parcialmente digeridas. La fase intestinal comienza cuando los alimentos abandonan el estómago después de 1 a 3 horas (Sensoy, 2021; G. Zhu et al., 2021).

La mayoría de las transformaciones que permiten a los alimentos ser utilizados por el organismo ocurren en el intestino delgado, donde tiene lugar la mayor parte de la absorción de los nutrientes. Cuando el quimo, la mezcla de alimentos parcialmente digerida y secreciones gástricas proveniente del estómago, ingresa al duodeno estimula al páncreas en primer lugar a liberar una solución concentrada de bicarbonato que neutraliza el jugo gástrico altamente ácido. El páncreas a su vez secreta diversos zimógenos pancreáticos, los cuales una vez en el duodeno se convierten a enzimas activas como la tripsina, la quimotripsina, la lipasa pancreática (50 KDalton), la amilasa pancreática y la α -glucosidasa (260 kDalton). El quimo además de mezclarse con dichas enzimas, se mezcla con la bilis, una solución acuosa compuesta por sales biliares,

fosfolípidos, colesterol, bilirrubina (un producto de descomposición de los glóbulos rojos), electrolitos y agua producida por el hígado y almacenada en la vesícula biliar antes de ser liberada en el intestino delgado. La bilis ayuda a emulsionar los lípidos hidrofóbicos en el intestino delgado, lo cual es necesario para el acceso y la acción de la lipasa pancreática. En esta etapa, las enzimas digestivas descomponen proteínas, carbohidratos, triglicéridos y ácidos nucleicos en moléculas más pequeñas. La α -glucosidasa hidroliza enlaces α -D-1,4 terminales no reductores liberando glucosa y oligosacáridos. La lipasa pancreática tiene la función de hidrolizar los enlaces éster en los triglicéridos para formar diacilglicéridos y monoacilglicéridos. La amilasa pancreática puede hidrolizar el almidón en disacáridos como la maltosa, pero, en este punto, disacáridos como la sacarosa y la lactosa aún no pueden descomponerse en sus monómeros. La descomposición de los productos de la digestión continua en la superficie del borde del cepillo que es la superficie especializada de las células epiteliales intestinales. El borde del cepillo está compuesto por microvellosidades que secretan enzimas como maltasa-glucoamilasa, sacarasa-isomaltasa, lactasa y peptidasas, hidrolizan disacáridos, péptidos y nucleótidos a monosacáridos y aminoácidos. Estos monómeros pueden atravesar el epitelio intestinal y ser transportados al torrente sanguíneo (Martinez-Gonzalez, Díaz-Sánchez, et al., 2017; Patricia & Dhamoon, 2022; Sensoy, 2021).

La digestión en el intestino grueso, de los compuestos que escapan a la absorción en el intestino delgado, representa el último paso en la descomposición de los alimentos y la absorción de nutrientes antes de la eliminación de los desechos. El colon alberga una población diversa de microorganismos conocida como microbiota intestinal, que supera en número a las células del cuerpo humano. Esta comunidad está compuesta principalmente por bacterias anaeróbicas estrictas, capaces de fermentar los componentes de los alimentos no digeridos en el tracto gastrointestinal superior (Olvera-Rosales et al., 2021; Wojtunik-Kulesza et al., 2020). La composición y la proporción de las diferentes especies que forman la microbiota intestinal es muy diversa dentro de la población humana y cada individuo tiene sus propias características, con un perfil propio

de especies microbianas, comparable a una huella dactilar. La composición y el perfil de la microbiota intestinal están influenciadas por diversos factores, como la edad, la ubicación geográfica, el entorno, los hábitos alimentarios (incluidos los probióticos), la salud, el uso de antibióticos, así como la forma en que un individuo nace. A pesar de la gran diversidad de especies bacterianas, la mayoría de ellas pertenecen a solo cuatro filos bacterianos: Firmicutes (64%), Bacteroidetes (23%), Proteobacteria (8%) y Actinobacteria (3%) (Makarewicz et al., 2021). La microbiota intestinal desempeña un papel fundamental al colonizar las superficies intestinales, exhibiendo una actividad enzimática diversa, siendo capaz de digerir principalmente fibras dietarias que escapan a la degradación en el intestino delgado (Sensoy, 2021). Como se mencionó anteriormente, la fermentación de prebióticos resulta en la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs). Estos ácidos desempeñan un papel crucial, ya que, por un lado, afectan diversos mecanismos celulares, sirven como fuente esencial de energía para los tejidos colorrectales, ejercen efectos antiinflamatorios y antimicrobiano y participan en las vías de señalización del eje microbiota-intestino-cerebro (Makarewicz et al., 2021; Olvera-Rosales et al., 2021). El contenido de ácidos grasos de cadena corta experimenta un aumento desde aproximadamente 6 a 8 mM en el íleon hasta alcanzar valores de 29 a 32 mM en el ciego. Igualmente, el contenido químico del quimo influye en la composición de la microbiota y en los metabolitos producidos, lo cual puede tener un impacto significativo en la salud. Otro rasgo destacado de la microbiota es su capacidad para metabolizar sales biliares que alcanzan el colon, y este proceso se acompaña por la síntesis de vitaminas esenciales como la niacina, la vitamina B1 y la vitamina K (Sensoy, 2021).

Además, la microbiota intestinal es capaz de metabolizar compuestos fenólicos cambiando sus estructuras químicas (Bié et al., 2023).

1.3.2. Metabolismo de los compuestos fenólicos en el tracto gastrointestinal

Los compuestos fenólicos interactúan con otros componentes que forman parte del alimento como proteínas, carbohidratos, lípidos y fibra. Estas interacciones parecen

afectar su bioaccesibilidad y la biodisponibilidad y en consecuencia el impacto que podrían tener sobre la salud (Tamargo et al., 2022). Los compuestos fenólicos deben estar libres de dichas interacciones moleculares con los componentes de los alimentos, como fibras, proteínas o lípidos para ser bioaccesibles antes de ser absorbidos. La edad, el sexo, las patologías, la genética, determinadas condiciones fisiológicas, las actividades enzimáticas y el estado de la microbiota son factores del consumidor que también afectan la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos (Núñez-Gómez et al., 2023). A su vez, la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos está profundamente influenciada por la gran diversidad de estructuras químicas de dichos compuestos. Dentro de la literatura científica, se han clasificado según su biodisponibilidad siendo las isoflavonas las más biodisponibles, seguidas de los ácidos fenólicos, los flavanoles, los flavanones y los flavonoles, mientras que las antocianinas y las proantocianidinas son los compuestos fenólicos con menor biodisponibilidad (Lippolis et al., 2023). Es relevante señalar que la presencia de dichos compuestos se ha reportado tanto en el orujo de uva tinta (Rocchetti et al., 2021; Troilo et al., 2022) como en la cáscara de uva tinta Tannat (Fernández-Fernández et al., 2022).

La masticación de los alimentos en la boca representa la primera fase de la digestión de los polifenoles. Sin embargo, su impacto es menos evidente debido a la breve interacción de las enzimas orales con el bolo alimenticio y su influencia se limita principalmente a alimentos ricos en carbohidratos (Wojtunik-Kulesza et al., 2020). Igualmente, se ha observado que la saliva juega un papel importante ya que los compuestos fenólicos pueden interactuar con enzimas y proteínas salivales, destacando a las proteínas ricas en prolina e histidina, albúmina salival y mucinas. Se ha reportado que en la cavidad bucal, pequeñas cantidades de antocianinas se hidrolizan a ácidos fenólicos o a sus ligandos glicosídicos correspondientes y que los taninos pueden ser precipitados por proteínas a través de enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (Eran Nagar et al., 2020; Wojtunik-Kulesza et al., 2020; Yang et al., 2022).

La liberación continua de los polifenoles en el estómago gracias a la acción de ácidos gástricos y enzimas que hidrolizan las macroestructuras de los componentes del alimento

(Núñez-Gómez et al., 2023). Si bien la absorción de polifenoles en el estómago es limitada, ciertos polifenoles pueden liberarse de la matriz alimentaria, ser hidrolizados y absorbidos (Yang et al., 2022). Por ejemplo, ciertas antocianinas pueden absorberse rápidamente en la fase gástrica, posiblemente a través de una bili-translocasa, un transportador de membrana de aniones orgánicos, y llegar al torrente sanguíneo. Algunos ácidos fenólicos libres también pueden ser absorbidos en el estómago (Ed Nignpense et al., 2021; Wojtunik-Kulesza et al., 2020). Los oligómeros de flavonoides, como las procianidinas, pueden degradarse en unidades más pequeñas durante la digestión gástrica (Ed Nignpense et al., 2021).

En relación con la etapa intestinal, la mayoría de los compuestos fenólicos presentan niveles de absorción muy bajos en el intestino delgado. Se ha demostrado que en esta etapa, solo se absorbe entre el 5% y el 10% del total de polifenoles ingeridos (Ray & Mukherjee, 2021; Yang et al., 2022). En términos generales, los polifenoles pequeños pueden ser directamente absorbidos en el intestino delgado, mientras que los polifenoles complejos permanecen indigestos hasta el intestino grueso. Según la clasificación de los polifenoles en EPPs y NEPPs, los EPPs pueden absorberse parcialmente en los enterocitos intestinales de la parte superior del intestino delgado, ya que no están unidos a otros componentes de los alimentos y, por lo tanto, son bioaccesibles (Lippolis et al., 2023; Núñez-Gómez et al., 2023).

En el intestino delgado, donde el pH es más elevado que el pH estomacal, se producen diversos eventos que afectan a los compuestos fenólicos. Algunas de las proantocianidinas oligoméricas en el intestino delgado pueden despolimerizarse para liberar monómeros de (epi)catequina para su posterior absorción (Yang et al., 2022). Las antocianinas, por otro lado, muestran una baja estabilidad a un pH elevado, lo que conduce a su degradación y las convierte en uno de los flavonoides menos bioaccesibles. Esta degradación espontánea puede dar como producto a ciertos ácidos fenólicos (Eran Nagar et al., 2020; Yang et al., 2022). Asimismo, en el entorno del intestino delgado, los flavonoides para que sean bioaccesibles pueden experimentar diversos procesos entre los que se encuentran, la deglicosilación, glucuronidación, metilación, sulfonación e

hidroxilación (Ray & Mukherjee, 2021; Wojtunik-Kulesza et al., 2020). Los flavonoides, que en su mayoría se encuentran en forma de conjugados glucósidos, llegan a la membrana en cepillo de las células epiteliales del intestino delgado, donde pueden ser hidrolizados por la lactasa-floretina hidrolasa (LPH). Esta enzima puede hidrolizar una amplia gama de O- β -D-glucósidos de flavonoides, excluyendo a los polifenoles unidos a una unidad de ramnosa, como la rutina (rutinosido de quercetina). La hidrólisis enzimática resulta en la liberación de la aglicona con mayor lipofilicidad, capaz de atravesar la membrana celular y difundir así pasivamente por las células epiteliales intestinales. Una vía alternativa implica la absorción de glucósidos de polifenoles en las células epiteliales, donde pueden ser hidrolizados aún más por la β -glucosidasa citosólica (CBG). Después de tales transformaciones, las agliconas o los metabolitos de agliconas absorbidas pasan al torrente sanguíneo. Los polifenoles que ingresan al torrente sanguíneo generalmente se someten a un metabolismo adicional en el hígado y el riñón. En estas etapas, los metabolitos resultantes pueden ser metabolizados adicionalmente por enzimas conocidas como enzimas metabolizadoras de la fase II. La mayoría de dichas enzimas catalizan reacciones de conjugación, y los productos se convierten en derivados sulfatados, glucuronidados y metilados (Eran Nagar et al., 2020; Yang et al., 2022).

Los estudios respaldan lo mencionado previamente sobre los cambios en los compuestos fenólicos de los subproductos de la vinificación durante la digestión. Por ejemplo, se ha observado una disminución de los flavanoles y las procianidinas poliméricas en extractos de tallos de uva después de pasar por el intestino delgado (Nieto et al., 2023). Además, en el caso de un extracto de cáscara de uva Tannat obtenido del orujo, se informó una pérdida de propiedades bioactivas, posiblemente debido a la degradación de los compuestos fenólicos durante la simulación digestiva (Fernández-Fernández et al., 2020). Sin embargo, los ácidos fenólicos se han mostrado como los más estables durante este proceso de simulación digestiva (Nieto et al., 2023).

Los compuestos que no se absorben en el intestino delgado, como algunas antocianinas no degradadas, y proantocianidinas (Yang et al., 2022) alcanzan el intestino grueso, específicamente el colon. En este sitio, están expuestos a la acción de la microbiota

intestinal, que los metaboliza extensamente. Este proceso conduce a la formación de metabolitos con estructuras distintas de los compuestos fenólicos originales (Eran Nagar et al., 2020; Yang et al., 2022). En el intestino grueso los polifenoles, son convertidos en metabolitos de bajo peso molecular por las comunidades microbianas intestinales, generando compuestos más biodisponibles para la absorción a través de la barrera colónica, que sus compuestos originales (Eran Nagar et al., 2020; Lippolis et al., 2023). Tomando como ejemplo a las antocianinas, el paso inicial del metabolismo bacteriano implica la ruptura del enlace glucosídico llevando a la formación de la aglicona de la antocianina. Las enzimas bacterianas α ,L-ramnosidasa y β ,D-glucosidasa son las responsables de la deglicosilación de las antocianinas. Posteriormente, las agliconas pueden cambiar espontáneamente para formar bases quinoides en el pH del intestino grueso, y descomponerse aún más en un ácido fenólico y un aldehído a través de un intermediario α -dicetona. El ácido protocatecuico se ha informado como uno de los principales productos de la metabolización de las antocianinas. Igualmente, la existencia de diversas combinaciones de pasos, mediante el metabolismo de enzimas o ruptura espontánea, lleva a diferentes metabolitos de aldehído y ácido fenólico a partir de una misma antocianina (Eran Nagar et al., 2020). Otros compuestos presentes en el orujo de uva, como flavonoles (kaempferol-3-O-rutinósido) y flavanoles (epigallocatequina, catequina, epicatequina, procianidinas), se han reportado también con capacidad para ser metabolizados por la microbiota intestinal dando como productos finales ácidos fenólicos. Se ha sugerido que el metabolismo colónico de polifenoles podría considerarse como el eslabón perdido entre el consumo de ciertos polifenoles y su actividad biológica (Williamson & Clifford, 2010). Los propios ácidos fenólicos también pueden convertirse aún más en el intestino grueso. Por ejemplo, durante las conversiones de ácidos hidroxicinámicos por la microbiota intestinal en ensayos *in vitro*, se observó que el ácido cafeico y sus ésteres, el ácido caftarico y el ácido clorogénico se transformaron en ácido 3-(3'-hidroxifenil)propiónico y pequeñas cantidades de ácido benzoico (Eran Nagar et al., 2020). Las proantocianidinas presentes en el orujo de uva tinta debido a su alto peso molecular, es poco probable que sean absorbidos en el intestino delgado, sino que pasan

al colon (Ed Nignpense et al., 2021) donde son metabolizadas por la microbiota intestinal en varios componentes (Rauf et al., 2019).

Los metabolitos secundarios derivados del metabolismo microbiano de los polifenoles actúan como moléculas prebióticas que, a su vez, pueden modular el crecimiento de cepas bacterianas específicas (Lippolis et al., 2023). Después de la biotransformación de los compuestos por la microbiota en catabolitos, algunos de ellos pueden ejercer beneficios en el intestino o, pueden ser absorbidos por las células del colon y transportados a través de la vena porta al hígado, donde se pueden metabolizar (Núñez-Gómez et al., 2023).

Por otro lado, las fibras dietarias como la xilosa, la celulosa, los β -glucanos y los arabinoxilanos que están unidos a polifenoles son sustratos del metabolismo microbiano, lo que resulta en la producción de los anteriormente mencionados, SCFAs (Ed Nignpense et al., 2021). Los SCFAs se transportan al sistema circulatorio sistémico y pueden afectar directamente el metabolismo del huésped al unirse a receptores acoplados a proteínas G. Estos receptores se encuentran expresados en varios tejidos metabólicamente activos y están involucrados en respuestas y regulación de diversos procesos, incluyendo la homeostasis de la glucosa y el metabolismo de lípidos. Además, los SCFAs son una importante fuente de energía para las células epiteliales intestinales y contribuyen a fortalecer la función de barrera del intestino, lo que reduce la entrada de microbios patógenos y moléculas microbianas al sistema circulatorio sanguíneo generando una disminución en las respuestas inmunitarias asociadas y una mejora de la salud (Myhrstad et al., 2020).

En el contexto de la temática abordada, se propone el uso del orujo de uva Tannat como parte de los ingredientes en el desarrollo de un potencial alimento funcional, principalmente debido a sus propiedades bioactivas, las cuales podrían atribuirse a su contenido de fibra dietética y compuestos fenólicos. Dichos compuestos fenólicos pueden ser identificados mediante métodos analíticos avanzados, como es la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un arreglo de diodos y espectrometría de masas (HPLC-DAD-MS, por sus siglas en ingles), con el objetivo de determinar cuáles podrían

ser los compuestos con potencial para otorgar beneficios para la salud del consumidor. Dicha identificación debería realizarse en el subproducto como tal, así como en el potencial alimento funcional ya que los compuestos fenólicos podrían no resistir el procesamiento del alimento. Sin embargo, para lograr este objetivo en el desarrollo de un potencial alimento funcional, no es suficiente simplemente desarrollar el producto, sino que también es crucial llevar a cabo estudios de bioaccesibilidad y biodisponibilidad. Estos estudios permiten comprender el potencial de los compuestos con propiedades bioactivas para ser liberados de la matriz alimentaria y mantenerse estables en las condiciones gastrointestinales. De esta manera, estos compuestos podrán estar potencialmente disponibles para ejercer sus efectos beneficiosos sobre la salud del consumidor.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Desarrollar formulaciones de galletas “fuente de fibra” con antioxidantes naturales provenientes del orujo de uva Tannat, identificando los compuestos bioactivos bioaccesibles y biodisponibles.

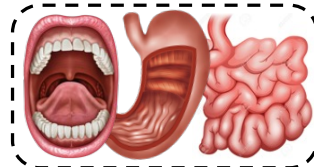
2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1.** Desarrollo de formulaciones de galletas variando el contenido del orujo de uva Tannat (TGP, por sus siglas en inglés) y de edulcorante (sucralosa) a incorporar a través de un diseño factorial con puntos centrales.
- 2.2.2.** Obtención del perfil sensorial de las formulaciones por parte de un panel de jueces semi entrenados y consumidores.
- 2.2.3.** Determinación de las propiedades bioactivas (antioxidante, antidiabético y antiobesidad) de las galletas, como de las Fracciones Bioaccesibles (FB) y Colónicas (FC) de las mismas, obtenidas luego de una simulación digestiva *in vitro*.
- 2.2.4.** Identificación de los compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD-MS en la galleta seleccionada y en su Fracción Colónica (FC).
- 2.2.5.** Estudios celulares: determinación de la inhibición de la formación de especies reactivas de oxígeno intracelulares sobre células de adenocarcinoma humano (Caco-2) y de la formación de óxido nítrico sobre macrófagos derivados de tumores de ratón (RAW264.7) por las Fracciones Bioaccesibles (FB) y Colónicas (FC) de las galletas.
- 2.2.6.** Estudio mediante cultivos celulares de la potencial biodisponibilidad de los compuestos fenólicos presentes en Fracción Colónica (FC) de la galleta seleccionada.
- 2.2.7.** Determinación de la capacidad prebiótica de la Fracción Colónica (FC) de la galleta seleccionada en un modelo de fermentación *in vitro*.

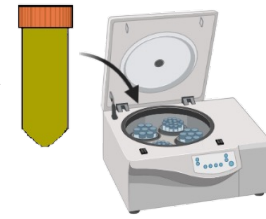
3. PLAN DE TRABAJO



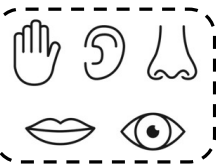
1. Desarrollo de galletas



5. Digestión gastrointestinal *in vitro*

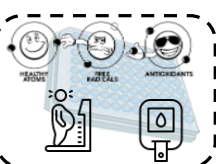


Fracción Bioaccesible (FB)



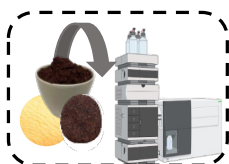
2. Evaluación sensorial

- Jueces semi entrenados
- Consumidores



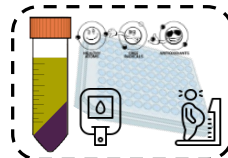
3. Propiedades bioactivas

- Antioxidante
- Antidiabético
- Antiobesidad



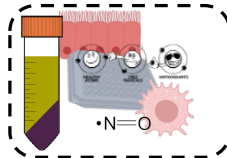
4. Identificación de compuestos fenólicos

HPLC-DAD-MS



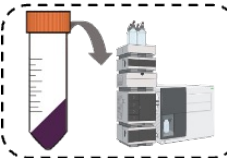
6. Análisis de propiedades bioactivas acelulares

- Antioxidante
- Antidiabético
- Antiobesidad



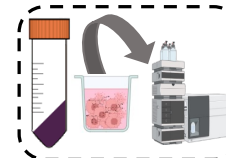
7. Análisis de propiedades bioactivas celulares

- Antioxidante
- Antiinflamatorio



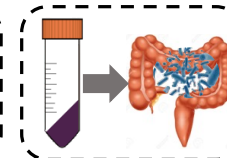
8. Identificación de compuestos fenólicos

HPLC-DAD-MS



9. Identificación de compuestos fenólicos captados

HPLC-DAD-MS



10. Fermentación colónica *in vitro*

- HPLC
- PCR-DGGE

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Matriz de partida

El orujo de uva Tannat fue provisto por la bodega Bouza S.A (Montevideo, Uruguay).

4.1.2. Reactivos utilizados

Todos los solventes y reactivos utilizados en los análisis fisicoquímicos, la digestión gastrointestinal *in vitro* y el análisis de células fueron de grado analítico. El dimetilsulfóxido (DMSO), el reactivo de Folin, la sal de diamonio de 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido (Trolox), la fluoresceína (FL) sal disódica, el dihidrocloruro de 2,2'-azo-bis (2-metilpropionamida) (AAPH), la α -glucosidasa, el 4-metilumbeliferil- α -D-glucopiranosido (4-MUF), la lipasa pancreática, el 4-metilumbeliferil oleato (4-MUO), la α -amilasa humana (1500 U/mL), la pepsina porcina (25.000 U/mL), la pancreatina porcina (800 U/mL), la bilis bovina, el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), el Trypan Blue, la sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) y el lipopolisacárido de E. coli O55:B5 (LPS) fueron comprados de Sigma-Aldrich (MO, EE. UU.); las sales de solución de tampón Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , fueron adquiridos a través de EMSURE (Darmstadt, Alemania). El persulfato de potasio fue adquirido de J. T. Baker (Nueva Jersey, EE. UU.). Las células intestinales de adenocarcinoma humano (Caco-2) y las células de macrófagos derivados de tumores de ratón (RAW 264.7) se obtuvieron del American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EE. UU.). Las células se cultivaron utilizando medio Eagle modificado de Dulbecco alto en glucosa (4,5 g/L) con glutamina estable y piruvato de sodio (DMEM-HPSTA), suero fetal bovino inactivado por calor (FBS, 10% v/v) y antibióticos (penicilina y estreptomina en una proporción de 1:1, 1% v/v), lo cuales fueron todos comprados en Capricorn Scientific (Ebsdorfergrund, Alemania). Las galletas se elaboraron con harina de trigo, huevos, polvo de hornear, sucralosa, sal y aceite de girasol, adquiridos en tiendas locales en Montevideo (Uruguay).

4.2. Métodos

4.2.1. Preparación del orujo de uva Tannat

El orujo de uva Tannat (TGP, por sus siglas en inglés) se secó a 50 °C en un horno convencional hasta alcanzar peso constante (24 horas) (Fernández-Fernández et al.,

2019). El mismo se sometió a una reducción de tamaño de partícula utilizando un molinillo doméstico eléctrico de café.

4.2.2. Preparación de las galletas

Se prepararon 5 formulaciones de galletas siguiendo un diseño factorial con puntos centrales. Se seleccionaron 2 niveles de sustitución de harina de trigo por polvo de TGP: 20% m/m de la masa total húmeda (siendo éste el porcentaje máximo de sustitución observado en la literatura científica) (Boff et al., 2022) y 10% m/m de la masa total húmeda. Se seleccionaron 2 niveles de incorporación de edulcorante (sucralosa): 2 y 4% m/m de la masa total húmeda. El punto central presentó 15% m/m de la masa total húmeda de sustitución de harina de trigo por polvo de TGP y 3% m/m de la masa total húmeda de sucralosa. Además, se formularon galletas control sin sustitución con polvo de TGP y con diferentes porcentajes de sucralosa (2, 3 y 4% m/m de la masa total húmeda) con fines comparativos. Las formulaciones con las cantidades de los ingredientes para cada formulación se detallan en la **Tabla 1**. La masa se preparó mezclando todos los ingredientes secos, adicionando los ingredientes líquidos, mezclando y luego se cortó en formas y tamaños iguales. Las galletas se hornearon en un horno convencional a 180 °C durante 12 min. Posteriormente se sometieron a una reducción de tamaño de partícula utilizando un molinillo doméstico eléctrico de café, se empacaron y se almacenaron a temperatura de congelación (-20 °C) para sus posteriores análisis.

Tabla 1. Cantidad de ingrediente en las diferentes formulaciones de galletas.

Formulación de galleta (TGP% Sucralosa%)								
Ingrediente (%)	20% 4%	20% 2%	15% 3%	10% 4%	10% 2%	0 % 4%	0 % 3%	0 % 2%
Harina de trigo	47,17	49,17	54,17	57,17	59,17	67,17	68,17	69,17
Polvo de TGP	20	20	15	10	10	0	0	0
Polvo de hornear	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Sal	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
Sucralosa	4	2	3	4	2	4	3	2
Huevo	14	14	14	14	14	14	14	14
Aceite de girasol	14,25	14,25	14,25	14,25	14,25	14,25	14,25	14,25
Agua	c.n	c.n	c.n	c.n	c.n	c.n	c.n	c.n

c.n: cantidad necesaria.

Con el objetivo de comprender y modelar la relación entre diversas variables independientes (TGP% y sucralosa%) y las variables dependientes (propiedades bioactivas) se realizó un análisis de regresión múltiple ajustándose al modelo lineal con la siguiente ecuación:

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (1)$$

Donde:

β_0 indica el punto de intersección

$\beta_1 \beta_2$ son los coeficientes lineales correspondientes al % de TGP y al % de sucralosa, respectivamente

β_{12} representa la interacción entre las variables independientes (TGP% y sucralosa%).

4.2.3. Evaluación sensorial

El análisis sensorial se realizó por jueces semi entrenados y consumidores siguiendo los principios establecidos en la Declaración de Helsinki. Previamente a llevar a cabo dicho estudio, el mismo fue sometido a revisión y obtuvo la aprobación del Comité de Ética de Investigación en Humanos de la Facultad de Química de la Universidad de la República en Montevideo, Uruguay. Todos los participantes brindaron su consentimiento informado por escrito para formar parte del estudio y se les informó acerca de la opción de retirarse en cualquier momento.

4.2.3.1. Análisis del perfil sensorial con jueces semi entrenados

Las 5 galletas formuladas fueron evaluadas por 15 jueces semi entrenados (entre 30 y 60 años). Las galletas se presentaron a cada juez en forma simultánea y mediante una metodología descriptiva rápida (denominada en inglés como Flash Profile) los mismos seleccionaron a su criterio los atributos sensoriales que creían más apropiados para describir a cada formulación. Una vez establecidos los atributos sensoriales, las 5 muestras se evaluaron utilizando escalas no estructuradas de 10 cm de longitud ancladas con "poco" y "mucho" para los diferentes atributos anteriormente seleccionados. Las evaluaciones se realizaron en el Laboratorio de Evaluación Sensorial de Facultad de Química diseñado según la norma ISO 8589 (ISO, 1988).

4.2.3.2. Análisis del perfil sensorial y aceptabilidad con consumidores

El análisis sensorial con consumidores se llevó a cabo con las formulaciones de galletas que previamente mostraron diferencias significativas en ciertos atributos sensoriales en el análisis del perfil sensorial por jueces semi entrenados. Dicho estudio tuvo como objetivo evaluar tanto la aceptabilidad como el perfil sensorial de las 3 muestras por 101 consumidores, con edades comprendidas entre 18 y 65 años, en la ciudad de Montevideo, seleccionados en base a su interés en participar en el estudio. Las muestras se presentaron siguiendo un diseño de bloques completos equilibrados. Para cada una de las muestras, se les pidió a los consumidores que indicaran su grado de aceptabilidad general utilizando una escala hedónica de 9 puntos, que iba desde "Me disgusta muchísimo" hasta "Me gusta muchísimo". Además, se emplearon preguntas de tipo "marque todo lo que corresponda" (CATA, por sus siglas en inglés) y evaluaciones de lo adecuado (JAR, por sus siglas en inglés) (Jaeger et al., 2015). Se proporcionó a los participantes una lista de 27 atributos sensoriales, entre los cuales debían seleccionar aquellos que consideraran apropiados para describir las 3 galletas que estaban evaluando. Al final del estudio, los consumidores respondieron a una breve encuesta sobre datos sociodemográficos y consumo de edulcorantes.

4.2.4. Identificación de los compuestos fenólicos

La identificación de los compuestos fenólicos se realizó en la galleta con 20% de TGP y 4% de sucralosa, en su respectiva galleta control (galleta con 4% de sucralosa) y en el TGP como tal. También se identificaron los compuestos fenólicos en las Fracciones Colónicas (FC) del TGP y de las galletas mencionadas, siendo las FC las fracciones insolubles obtenidas tras la simulación de la digestión gastrointestinal (su obtención se describe posteriormente en la sección 4.2.7.). Los compuestos fenólicos fueron extraídos utilizando una versión modificada del método descrito por Peña-Vázquez et al. (2022). La extracción se realizó con 50 mg de galleta o FC y 1 mL de una solución de metanol/agua acidificada (80:20 v/v con 0,1% de ácido fórmico), seguido de sonicación (90 min), agitación en vortex (1 min) y centrifugación (10 min a 9.500 rpm). El sobrenadante fue recolectado y luego el residuo fue re-extraído utilizando 0,5 mL de una solución de metanol/agua acidificada, sometido a sonicación (25 min), agitación en vortex (1 min) y

centrifugación en las mismas condiciones. Los sobrenadantes de ambas extracciones fueron combinados y almacenados a -20 °C para su posterior análisis mediante HPLC-DAD-MS, tal como se describe en Olt et al. (2023). Brevemente, el análisis HPLC-DAD-MS se llevó a cabo utilizando una columna de HPLC de fase reversa C18 Kinetex C18-EVO (tamaño de partícula de 5 µm, 150 × 4,6 mm de diámetro interno, Phenomenex, California, EE. UU.) termostaticada a 35 °C. La fase móvil consistió en un 0,1% de ácido trifluoroacético (A) y acetonitrilo (B), siguiendo el perfil de elución de gradiente: desde 0 hasta 100% A en 3 min, desde 4 hasta 30% B en 50 min, desde 30 hasta 98% B en 5 min, y finalmente una elución isocrática con 98% B durante 2 min, a una velocidad de flujo de 1,3 mL/min. La detección se realizó a 280 nm. Los análisis de HPLC-DAD-MS se llevaron a cabo utilizando un detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo Shimadzu (Shimadzu, Tokio, Japón) equipado con una interfaz de ionización por electrospray (ESI). El voltaje de la fuente se estableció en 2,50 kV, y la temperatura de la capilar se mantuvo a 250 °C. Los espectros se registraron en modo de iones positivos dentro del rango de m/z de 100 a 2000. Las concentraciones de los diferentes compuestos fenólicos identificados fueron expresadas en base a una curva de calibración (0,1-1,0 mg/mL) utilizando como estándar malvidina-3-O-glucósido.

4.2.5. Contenido de Polifenoles Totales

El Contenido Total de Fenoles (TPC) se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu como se describe en Fernández-Fernández et al. (2019). El mismo mide en condiciones alcalinas la oxidación de los grupos hidroxilos que al reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu (siendo éste una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato) conduce a una reducción del reactivo y a un cambio de color de amarillo a azul. La cuantificación de dicho cambio de color se realiza mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 750 nm. Para llevar a cabo el procedimiento, 10 µL del patrón (ácido gálico) o de las muestras de galletas (los compuestos fenólicos fueron extraídos con una solución de DMSO:agua destilada (6:94) según Fernández-Fernández et al. (2019)) se colocaron en una placa de 96 pocillos transparente, seguidos de 200 µL de una solución al 20% m/v de carbonato de sodio para generar el medio alcalino. Luego de 2 min, se añadieron 50 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido en una proporción de 1/5). Tras una incubación

de 30 min en la oscuridad, se midió la absorbancia a 750 nm utilizando un lector de microplacas (modelo Thermo Scientific Multiskan FC, Massachusetts, USA). Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico (GAE, por sus siglas en inglés) por g de muestra. Es importante destacar que este reactivo no es específico para compuestos fenólicos, ya que los grupos fenólicos presentes en proteínas u otras sustancias que puedan reducir el reactivo, también pueden participar en la reacción de reducción, como se menciona en el estudio de Ky et al. (2014).

4.2.6. Análisis de propiedades bioactivas

Para el análisis de las bioactividades *in vitro* (capacidad antioxidante por los métodos de ABTS y ORAC-FL, capacidad antidiabética por la inhibición de la α -glucosidasa y capacidad antiobesidad por la inhibición de la lipasa pancreática) los compuestos bioactivos presentes en las galletas fueron extraídos con una solución de DMSO y agua destilada en una proporción 6:94 (Fernández-Fernández et al., 2019).

4.2.6.1. Capacidad antioxidante por el método ABTS

En la mayoría de los métodos que contemplan el mecanismo de acción ET, la actividad antioxidante se evalúa mediante espectrofotometría. Durante este proceso, los cambios en la absorbancia se representan en función de la concentración del antioxidante (Siddeeg et al., 2021). El ensayo de ABTS es uno de los métodos espectrofotométricos más utilizados para la medición de la actividad antioxidante total implicando el mecanismo de acción ET (Ding et al., 2020; Re et al., 1999). Es una técnica de decoloración en la que se genera un radical estable antes de reaccionar con los antioxidantes. La técnica implica, en primer lugar, la generación del radical catiónico $ABTS^{\cdot+}$ (verde petróleo) a través de la reacción entre el ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazol-6-sulfónico)] con persulfato de potasio. La reacción entre los antioxidantes con el radical catiónico, genera la reducción del mismo formando el complejo reducido $ABTS^{2-}$ (incolore). El grado de decoloración se sigue mediante espectrofotometría UV-Vis a 750 nm (Re et al., 1999). Para comenzar con dicho método, en primer lugar, se activó la solución de ABTS (7 mM) con persulfato de potasio (140 mM) dejando la solución en oscuridad a temperatura ambiente durante 14-16 horas para generar la formación del radical catiónico $ABTS^{\cdot+}$.

Dicho radical (1 mL) se diluyó en (25 mL) de solución salina de fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) (5 mM pH 7,4) hasta obtener una solución de absorbancia 0,70 (\pm 0,02) a 750 nm. En una placa transparente de 96 pocillos, se colocaron 10 μ L del patrón (Trolox) o de las muestras de galletas, seguidos de 190 μ L del radical catiónico ABTS^{•+}. Tras una incubación de 10 min en la oscuridad, se midió la absorbancia a 750 nm utilizando un lector de microplacas (modelo Thermo Scientific Multiskan FC, Massachusetts, USA). Los resultados se expresaron en μ mol de equivalentes de Trolox (TE, por sus siglas en inglés) por g de muestra (Fernández-Fernández et al., 2019; Re et al., 1999).

4.2.6.2. Capacidad antioxidante por el método de ORAC-FL

Los ensayos que contemplan el mecanismo de acción HAT, como es el ensayo de ORAC-FL, evalúan el potencial del antioxidante para neutralizar los ROS mediante su capacidad para donar átomos de hidrógeno (Siddeeg et al., 2021). El ensayo de ORAC-FL, es una técnica ampliamente utilizada en la investigación clínica y de alimentos para medir la actividad antioxidante, el cual se lleva a cabo utilizando una sonda fluorescente sintética llamada fluoresceína. La fluoresceína, al reaccionar con radicales peroxilos generados por un compuesto químico llamado AAPH [dihidrocloruro de 2,20-azobis-(2-amidino-propano)], sufre daño oxidativo, lo que resulta en la pérdida de su fluorescencia (Ding et al., 2020; Kumar et al., 2017). El ensayo se basa en medir la neutralización de los ROS por parte de los antioxidantes, causando menor daño oxidativo a la fluoresceína (menor decaimiento de la fluorescencia). Para llevar a cabo dicho ensayo, se colocaron 20 μ L del patrón (Trolox) o de las muestras de galletas o PBS (utilizado como control sin agente oxidante o como blanco de medición sin patrón o muestra) en una placa negra con tapa de 96 pocillos. Luego, se añadieron 120 μ L de una solución de fluoresceína (70 nM) y se incubó a 37 °C en la oscuridad durante 10 min. Posteriormente, se adicionaron 60 μ L de AAPH (12 mM) (a excepción del control) el cual se descompone para generar el radical peroxilo en las condiciones del ensayo (37 °C en PBS 75 mM pH 7,4). Las mediciones de fluorescencia (RFU) se realizaron a 37 °C cada min durante 80 min, utilizando longitudes de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 520 nm en un lector de microplacas fluorímetro Varioskan Lux (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Los resultados se

expresaron en μmol de equivalentes de Trolox (TE, por sus siglas en inglés) por g de muestra (Dávalos et al., 2005; Fernández et al., 2017).

4.2.6.3. Capacidad antidiabética

La capacidad antidiabética se evaluó mediante la determinación de la capacidad de las muestras para inhibir la α -glucosidasa según lo descrito por Fernández-Fernández et al. (2019). En dicho procedimiento, se empleó el sustrato enzimático 4-MetilUmbeliferil- α -D-glucopiranosido (4-MUF). Cuando el sustrato es hidrolizado por la α -glucosidasa genera un producto que emite fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisión}} = 460 \text{ nm}$). Para llevar a cabo dicho ensayo en una placa negra de 96 pocillos se colocaron 100 μL de las muestras de galletas con 100 μL de la solución de α -glucosidasa y 100 μL de 4-MUF. Para medir la actividad enzimática máxima (100% de actividad enzimática) se agregaron 100 μL de PBS, 100 μL de la solución de α -glucosidasa y 100 μL de 4-MUF. Las medidas de fluorescencia de los blancos de muestra, compuestos por 100 μL de muestra y 200 μL de PBS, se restaron a las medidas de las muestras con enzima y sustrato. La fluorescencia se midió durante 30 min de incubación a 37 °C midiendo cada 1 min en un lector de microplacas fluorímetro Varioskan™ Lux (software SkanIt RE 5.0, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) Se construyeron curvas dosis-respuesta [% Inhibición vs. [Muestra] (mg/mL)] para expresar los resultados como la concentración de la muestra que inhibe el 50% (IC_{50} , mg/mL) de la actividad enzimática de la α -glucosidasa (Fernández-Fernández et al., 2019).

4.2.6.4. Capacidad antiobesidad

La capacidad antiobesidad se evaluó mediante la determinación de la capacidad de las muestras para inhibir la lipasa pancreática según lo descrito por Fernández-Fernández et al. (2019). En dicho procedimiento, se empleó el sustrato enzimático 4-MetilUmbeliferil Oleato (4-MUO). Cuando el sustrato es hidrolizado por la lipasa pancreática, genera un producto que emite fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisión}} = 460 \text{ nm}$). Para llevar a cabo dicho ensayo en una placa negra de 96 pocillos se colocaron 50 μL de las muestras de galletas con 50 μL de la solución de lipasa pancreática y 100 μL de 4-MUO. Para medir la actividad enzimática máxima (100% de actividad enzimática) se agregaron 50 μL de

buffer Tris-Cl, 50 μ L de la solución de lipasa pancreática y 100 μ L de 4-MUO. Las medidas de fluorescencia de los blancos de muestra, compuestos por 50 μ L de muestra y 150 μ L de PBS, se restaron a las medidas de las muestras con enzima y sustrato. La fluorescencia se midió durante 30 min de incubación a 37 °C cada 1 min en un lector de microplacas fluorímetro Varioskan™ Lux (software SkanIt RE 5.0, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Se construyeron curvas dosis-respuesta [% Inhibición vs. [Muestra] (mg/mL)] para expresar los resultados como la concentración de la muestra que inhibe el 50% (IC₅₀, mg/mL) de la actividad enzimática de la lipasa pancreática (Fernández-Fernández et al., 2019).

Cabe mencionar que las enzimas evaluadas (α - glucosidasa y lipasa pancreática) fueron de origen porcino debido a la homología estructural con las de origen humano existiendo un 86% de homología estructural (Martinez-Gonzalez, Díaz-Sánchez, et al., 2017).

4.2.7. Simulación de la digestión gastrointestinal

Para evaluar qué podría suceder luego de la ingesta de las galletas se realizó una simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro* utilizando el protocolo estandarizado INFOGEST (Brodkorb et al., 2019). El mismo simula la fase oral, gástrica e intestino delgado (duodeno) de la digestión (**Figura 5**).

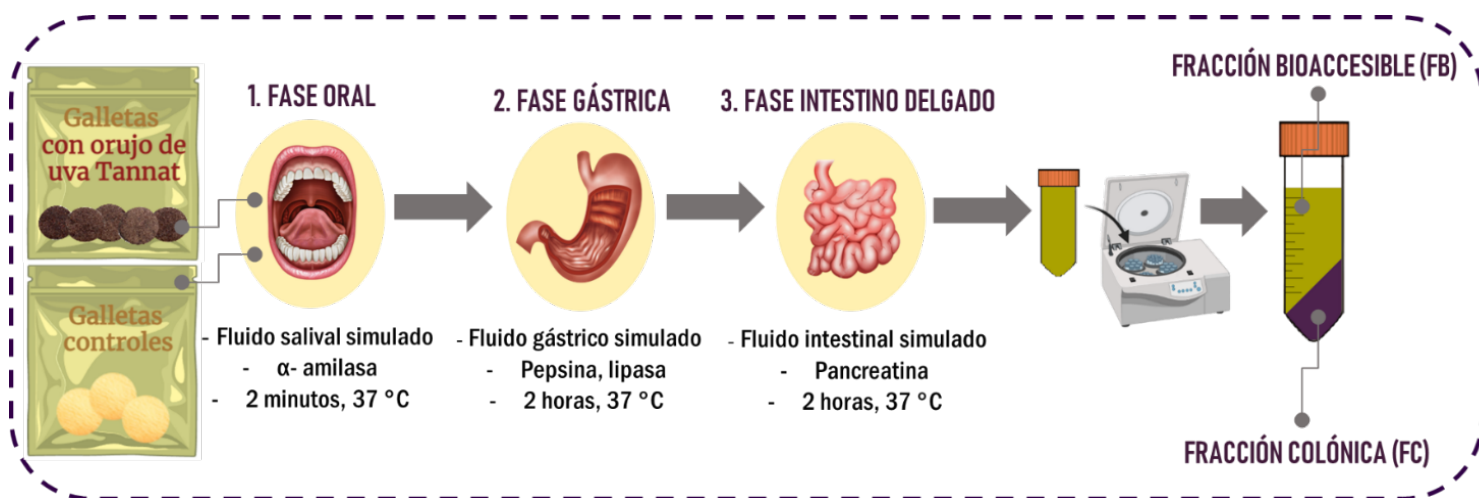


Figura 5. Esquema del protocolo INFOGEST utilizado para simular la digestión gastrointestinal finalizando con la obtención de las Fracciones Bioaccesibles (FB) y Fracciones Colónicas (FC) de las diferentes formulaciones de galletas.

En primer lugar, 2,5 g de cada formulación de galleta (TGP% sucralosa%: 20 % 4%, 20 % 2%, 15 % 3%, 10 % 4% y 10% 2%) y sus galletas controles (sin TGP) (sucralosa%: 4%, 3% y 2%) se sometieron a la fase oral con el objetivo de generar un bolo ingerible con una consistencia similar al que se produce en el paso de la masticación. Para ello las muestras se diluyeron con fluido salival simulado en una proporción 1:1 (p/v) siendo éste una mezcla de electrolitos [KCl, KH₂PO₄, NaHCO₃, MgCl₂(H₂O)₆, (NH₄)₂CO₃, HCl, CaCl₂(H₂O)₂]. A su vez, en esta etapa se agregó α -amilasa salival humana (75 U/mL) como la principal enzima presente en la boca. Las muestras se incubaron con agitación en un baño de agua a 37 °C durante 2 min. Para simular la fase gástrica, a la muestra oral se le agregó fluido gástrico simulado [KCl, KH₂PO₄, NaHCO₃, NaCl, MgCl₂(H₂O)₆, (NH₄)₂CO₃, HCl, CaCl₂(H₂O)₂] en una proporción 1:1 (v/v), pepsina porcina (2.000 U/mL) y lipasa pancreática porcina (60 U/mL). El pH fue ajustado a 3 y las muestras se incubaron con agitación en un baño de agua a 37°C por 2 horas. Para la fase intestinal, las muestras gástricas se mezclaron con fluido intestinal simulado [KCl, KH₂PO₄, NaHCO₃, NaCl, MgCl₂(H₂O)₆, HCl, CaCl₂(H₂O)₂] en una proporción 1:1 (v/v), pancreatina (100 U/mL) siendo ésta una mezcla de diversas enzimas (tripsina, amilasa, lipasa, ribonucleasa, proteasa) y sales biliares a pH 7. Las muestras nuevamente se incubaron con agitación en un baño de agua a 37 °C durante 2 horas. Finalmente, se llevó a cabo la inactivación enzimática en un baño de agua a 90 °C durante 10 min, seguido de una centrifugación (9.000 rpm, 10 min, 4 °C).

Al finalizar la centrifugación se obtuvieron dos fracciones simuladas (**Figura 5**): la fracción soluble denominada Fracción Bioaccesible (FB), la cual incluye los componentes solubles que podrían ser potencialmente absorbidos en el intestino delgado, y la fracción insoluble denominada Fracción Colónica (FC), implicando los compuestos no liberados y retenidos en la matriz del alimento. En el modelo de solubilidad, la separación por centrifugación seguida del análisis de los componentes solubles se ha reportado como una buena estimación de los compuestos disponibles para el transporte a través del epitelio intestinal (Wojtunik-Kulesza et al., 2020).

A las fracciones simuladas (FB y FC) obtenidas a partir de las distintas formulaciones de galletas se les determinó el contenido de polifenoles totales (sección 4.2.5), su capacidad antioxidante (sección 4.2.6.1; sección 4.2.6.2.), su capacidad antidiabética (sección 4.2.6.3) y su capacidad antiobesidad (sección 4.2.6.4.) tal como se describió para las distintas formulaciones de galletas sin digerir. Para realizar dichos análisis las FB se utilizaron tal como se obtuvieron luego de la simulación de la digestión, mientras que las FC se liofilizaron y se trataron con una solución de DMSO y agua destilada en proporción 50:50 con el fin de extraer los compuestos fenólicos. Ambas (FB y FC) fueron almacenadas a temperatura de congelación (-20 °C) hasta sus análisis.

Cabe destacar que, al valor obtenido del Contenido de Polifenoles Totales como de la capacidad antioxidante medido tanto por ABTS como para ORAC-FL, de cada FB, se le restó el valor obtenido del Contenido de Polifenoles Totales y de la capacidad antioxidante del blanco de digestión, el cual corresponde a los reactivos utilizados en la digestión *in vitro*, excluyendo la presencia de la muestra.

Por otra parte, para evaluar el impacto de la microbiota intestinal y así complementar la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro*, a las FC obtenidas a partir de la galleta con 20% de TGP y 4% de sucralosa, su galleta control con 4% de sucralosa y del TGP se les realizó un ensayo de fermentación colónica *in vitro*, tal como se describe posteriormente en la sección 4.2.9.

4.2.7.1. Índice de capacidad antioxidante luego de la digestión

El cambio en la capacidad antioxidante (% CA) tras la simulación de la digestión gastrointestinal se calculó como la proporción entre la capacidad antioxidante, medida mediante ABTS u ORAC-FL, para cada fracción de digestión (FB o FC), y la capacidad antioxidante presente en cada formulación de galleta antes de la digestión. Los resultados se expresaron en porcentajes, según lo descrito por Pinto et al. (2023), con ciertas adaptaciones, a través de la siguiente ecuación:

$$\% CA = \left(\frac{CA_{ld}}{CA_{ad}} * 100 \right) - 100 \quad (2)$$

Donde

CA: indica el porcentaje de cambio en la capacidad antioxidante de la FB o FC respecto a la galleta sin digerir.

CA Id: indica la capacidad antioxidante de la FB o la FC.

CA ad: indica la capacidad antioxidante de la galleta antes de la digestión.

4.2.8. Ensayos celulares

Para seguir avanzando en el desarrollo de alimentos funcionales, es crucial evaluar cómo los compuestos que atraviesan el tracto gastrointestinal pueden afectar a las células. En este estudio, se examinó el efecto antioxidante mediante la determinación de ROS intracelulares, así como el efecto antiinflamatorio evaluando la inhibición de la producción de NO. Además, se llevó a cabo un ensayo de captación de compuestos utilizando una monocapa de células intestinales. En conjunto, se permite comprender el potencial de los compuestos una vez que ingresan al organismo.

4.2.8.1. Viabilidad celular

Previamente a realizar la determinación de ROS intracelulares en células de adenocarcinoma colorrectal epitelial humano (células Caco-2) (sección 4.2.8.2.) y la determinación de la inhibición de formación de NO en macrófagos derivados de tumores de ratón (RAW 264.7) (sección 4.2.8.3.), se evaluó la viabilidad celular de dichas líneas celulares mediante el ensayo de MTT. Dicho ensayo se realizó con el fin de determinar el rango de concentraciones de las muestras de FB y FC, que resultaba en una viabilidad celular superior al 80%, para ser utilizada en dichos ensayos. El reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), de color amarillo, puede atravesar la membrana celular así como la membrana interna mitocondrial de células viables. Al ser metabolizado por las enzimas mitocondriales de las células metabólicamente activas es reducido a un producto insoluble, denominado formazan, de color violeta-azul. En consecuencia, el ensayo tiene una gran utilidad como un ensayo de medición de la actividad metabólica celular (Ghasemi et al., 2021). En este caso, el ensayo de MTT se realizó tal como se describe en Fernández-Fernández et al. (2019). Los macrófagos RAW 264.7 se sembraron en placas transparentes de 96 pocillos con tapa estériles a una densidad de 8×10^4 células/pocillo y se incubaron por 24 h, mientras que las células Caco-2 se sembraron a una densidad de 6×10^4 células/pocillo y se incubaron por 48 h. A

continuación, las células fueron incubadas con diversas concentraciones de las muestras (150 µL) durante un período de 24 horas. Posteriormente, se les añadieron 20 µL del reactivo MTT (6 mM) y se realizaron diferentes tiempos de incubación, dependiendo del tipo de célula: 30 min para los macrófagos RAW 264.7 y 1 hora para las células Caco-2. Posteriormente, se retiraron los sobrenadantes y se agregaron 100 µL de DMSO a cada pocillo, las placas se incubaron durante 15 min a oscuridad en la incubadora a 37 °C para lograr una mejor homogeneización. La absorbancia se midió a 570 nm utilizando un lector de placas Varioskan™ Lux (software SkanIt RE 5.0, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y se calculó el porcentaje de viabilidad como se detalla en la ecuación 3. El control negativo (C-) presentó DMEM-P/S sin FBS, lo que representaba el 100% de viabilidad celular. El control positivo consistió en DMEM-P/S sin FBS con DMSO (medio:DMSO, 50:50). Todas las determinaciones se realizaron en triplicado y en tres pasajes celulares diferentes.

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia C-}} * 100 \quad (3)$$

4.2.8.2. Capacidad antioxidante por la inhibición de la formación de ROS intracelulares

Para evaluar el efecto antioxidante de las muestras (FB y FC de la galleta con 20% de TGP y 4% de sucralosa, su formulación control con 4% de sucralosa y del TGP como tal) en células intestinales, se determinó la inhibición de la producción de ROS intracelulares bajo condiciones de inducción de la oxidación en células de adenocarcinoma colorrectal epitelial humano (células Caco-2) tal como se describe en Fernández-Fernández et al. (2022) con ciertas modificaciones. A pesar de su origen colónico, las células Caco-2 en condiciones de cultivo atraviesan una diferenciación espontánea y muestran características de enterocitos maduros, asemejándose a las células de la mucosa intestinal del intestino delgado humano, presentando uniones estrechas, bordes en cepillo y transportadores de salida y entrada en el compartimento basolateral (Iftikhar et al., 2020). El propósito de este método es determinar el total de ROS intracelulares utilizando la molécula de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) que, al ingresar a las células, las esterasas celulares eliminan los grupos acetilo, dando como resultado la

molécula de DCFH. La oxidación de la molécula de DCFH por parte de los ROS convierte la molécula en DCF, que emite fluorescencia verde a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm. Este método se ha utilizado ampliamente para detectar ROS intracelulares en el estudio de diversas condiciones (Hyeoncheol & Xiang, 2020). Para llevar a cabo dicho ensayo se utilizaron diluciones de las FB de las galletas tal como se obtuvieron después de la simulación de la digestión, mientras que las FC liofilizadas se prepararon en EtOH (95%):agua destilada (80:20, 8% v/v concentración final máxima de EtOH en el pocillo) en una concentración inicial de 100 mg/mL. Las soluciones de muestra se filtraron con filtros estériles de 0,22 μm y se prepararon diferentes concentraciones con DMEM-P/S sin FBS. En primer lugar, las células Caco-2 se sembraron a una densidad de 6×10^4 células/pocillo (150 μL /pocillo) en una placa transparente de 96 pocillos con tapa estéril y se incubaron a 37 °C durante 48 horas (tiempo en el cual las células mostraron confluencia). Las células fueron pretratadas con 100 μL de diferentes concentraciones de las muestras filtradas (FB y FC) durante 24 horas a 37 °C. Luego de las 24 horas, se quitaron las muestras y las células fueron incubadas con la sonda DCFH-DA (5 mg/mL en DMSO) durante 30 min. Una vez concluida la incubación con la sonda y tras el lavado de las células con PBS, se procedió a inducir la oxidación de dos formas diferentes: en el ensayo de "Prevención", solo se introdujo el agente oxidante (100 μL de AAPH, 1 mM); mientras que para el ensayo de "Prevención con co-administración", las muestras se administraron conjuntamente con el agente oxidante (AAPH, 1 mM). En ambos casos, las células se incubaron a 37 °C durante 2 horas.

La formación de ROS intracelulares se determinó midiendo la fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisión}} = 525 \text{ nm}$) utilizando un Varioskan™ Lux (software SkanIt RE 5.0, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Para normalizar los datos según el número de células viables, se realizó un ensayo de MTT (sección 4.2.8.1.) (Fernández-Fernández, Dellacassa, Medrano-Fernandez, et al., 2021) con una incubación de 1 hora. El cálculo del % de ROS se detalla en la ecuación 4. El control positivo (C+) presentó 1 mM de AAPH en DMEM-P/S sin FBS, lo que representaba el 100% de la formación de ROS. El

control negativo consistió en DMEM-P/S sin FBS sin tratamiento con AAPH. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y en tres pasajes celulares diferentes.

$$\% ROS = \frac{\text{Fluorescencia muestra}}{\text{Absorbancia MTT muestra}} * \frac{\text{Absorbancia MTT C+}}{\text{Fluorescencia C+}} * 100 \quad (4)$$

4.2.8.3. Capacidad antiinflamatoria por la inhibición de la producción de NO

Para evaluar el efecto antiinflamatorio de las muestras (FB y FC de la galleta con 20% de TGP y 4% de sucralosa, su formulación control con 4% de sucralosa y del TGP como tal) la inflamación fue inducida con lipopolisacárido (LPS) en macrófagos RAW 264.7 (macrófagos derivados de tumores de ratón) y se determinó la producción de NO como un indicador de inflamación crónica tal como se describe en Fernández-Fernández, Dellacassa, Nardin, et al. (2021). Para llevar a cabo dicho ensayo las muestras se utilizaron de la misma forma como se describe en la sección 4.2.8.2. Los macrófagos RAW 264.7 se sembraron a una densidad de 8×10^4 células/pocillo (100 μ L/pocillo) en una placa transparente de 96 pocillos con tapa estéril y se incubaron a 37 °C durante 24 horas, tiempo en el cual las células mostraron confluencia. Luego, las células fueron tratadas con 100 μ L de diferentes concentraciones de las muestras filtradas (FB y FC) durante 24 horas a 37°C. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y las células se trataron durante 24 horas con 150 μ L de las muestras filtradas junto con LPS a una concentración de 1 μ g/mL, que actúa como inductor de la inflamación. Tras la incubación, se trasvasaron 100 μ L de sobrenadante celular a otra placa de 96 pocillos no estéril y se combinaron con 100 μ L del reactivo de Griess, el cual reacciona con los nitritos derivados del NO producido por los macrófagos. Luego de incubarse durante 15 min en la oscuridad a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 550 nm utilizando un lector de placas Varioskan™ Lux (software SkanIt RE 5.0, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Para normalizar los datos según el número de células viables, se realizó un ensayo de MTT (sección 4.2.8.1.) (Fernández-Fernández, Dellacassa, Nardin, et al., 2021) con una incubación de 30 min. El cálculo del % de NO se detalla en la ecuación 5. El control positivo (C+) presentó 1 μ g/mL de LPS en DMEM-P/S sin FBS, lo que representaba el 100% de la producción de NO. El control negativo consistió en DMEM-P/S sin FBS (sin

tratamiento con LPS). Todas las determinaciones se realizaron en triplicado y en tres pasajes celulares diferentes.

$$\% NO = \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia MTT muestra}} * \frac{\text{Absorbancia MTT C+}}{\text{Absorbancia C+}} * 100 \quad (5)$$

4.2.8.4. Ensayo de captación de compuestos fenólicos

La absorción celular de los compuestos fenólicos presentes en la FC de la galleta con 20% de TGP y 4% de sucralosa y en la FC del TGP, se realizó tal como se describe en Fernández-Fernández, Dumay, Lazennec, et al. (2021) con ciertas modificaciones (**Figura 6**). Para llevar a cabo dicho ensayo se utilizaron las FC de las galletas tal como se describe en la sección 4.2.8.2. Las células Caco-2 se sembraron a una densidad de $3,9 \times 10^5$ células/pocillo (2,5 mL/pocillo) en una placa transparente estéril de 12 pocillos con tapa estéril y se incubaron a 37 °C durante 20 días (tiempo en el cual las células se diferencian) (Iftikhar et al., 2020), cambiando el medio día por medio. Luego de los 20 días, el sobrenadante se descartó, las células fueron lavadas con PBS y se depositaron las muestras (2 mL) preparadas en solución salina de Hank's (HBSS, por sus siglas en inglés) (FC galleta con 20% de TGP y 4% de sucralosa, FC del TGP y control con HBSS) durante 3 horas. Tras la incubación celular, se retiraron las muestras y se lavaron los pocillos con PBS. A continuación, las células se rasparon con 1 mL de metanol acidificado en frío (metanol con 0,1% v/v de ácido clorhídrico) y se filtraron con tamaño de poro de 0,22 μm a viales de HPLC ámbar. Las muestras fueron venteadas y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis posterior mediante HPLC-DAD-MS como se describe en la sección 4.2.4.

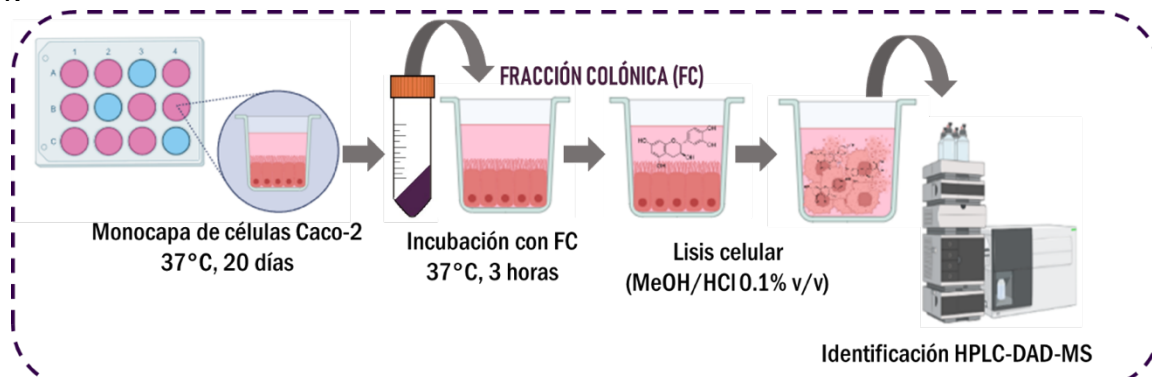


Figura 6. Esquema del ensayo de captación de compuestos fenólicos presentes en la FC de la galleta con 20% de TGP y 4% de sucralosa y la FC del TGP.

4.2.9. Ensayo de fermentación colónica *in vitro*

Para realizar el ensayo de fermentación de las FC (**Figura 7**) obtenidas a partir de la galleta con 20% de TGP y 4% de sucralosa, su galleta control con 4% de sucralosa, y del TGP (obtenidas como se detalla en la sección 4.2.7.), se utilizaron muestras de materia fecal provenientes de niños sanos de 1 a 3 años de edad (con dieta omnívora y que no hayan recibido tratamiento con antibióticos durante los 6 meses previos al estudio). Las muestras de heces fueron recopiladas por los padres según el protocolo proporcionado y con los materiales estériles entregados, y se enviaron al laboratorio el mismo día, junto con una nota de consentimiento informado en cumplimiento del protocolo aprobado por el Comité Central de Bioética de la Universidad Nacional de La Plata (mayo de 2017). Todas las muestras se mantuvieron a 4°C y se procesaron dentro de las 24 horas posteriores a la deposición para garantizar la viabilidad de los microorganismos presentes. Para la homogeneización de las heces, se suspendieron cantidades iguales (2 g) de las 5 muestras en solución salina de fosfato estéril (90 mL) y se mezclaron para obtener una mezcla diluida (1/10). Posteriormente, para preparar el inóculo fecal se colocaron 20 mL de la solución preparada en 80 mL de medio basal sin carbohidratos (1/5). Paralelamente a 0,15 g de cada FC se le adicionaron 15 mL del medio basal sin carbohidratos (concentración final del 0,5% p/v). Una vez preparadas las muestras se colocaron 1 mL de inóculo fecal y 1 mL de cada muestra. Las muestras se incubaron durante 24, 48 o 72 horas a 37 °C en jarras de anaerobiosis (AnaeroPack, Mitsubishi Gas Chemical Company, Japón). Muestras controles sin carbohidratos y con inulina comercial en la misma concentración (0,5% p/v) se incluyeron a modo comparativo. Luego de finalizados los tiempos de fermentación, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm por 10 min. Los sobrenadantes se filtraron utilizando filtros con un diámetro de poro de 0,22 µm y se almacenaron a -20 °C para el estudio de SCFAs. Por otro lado, los pellets obtenidos se almacenaron a -80 °C para su posterior caracterización de poblaciones microbianas (Bengoa et al., 2020).

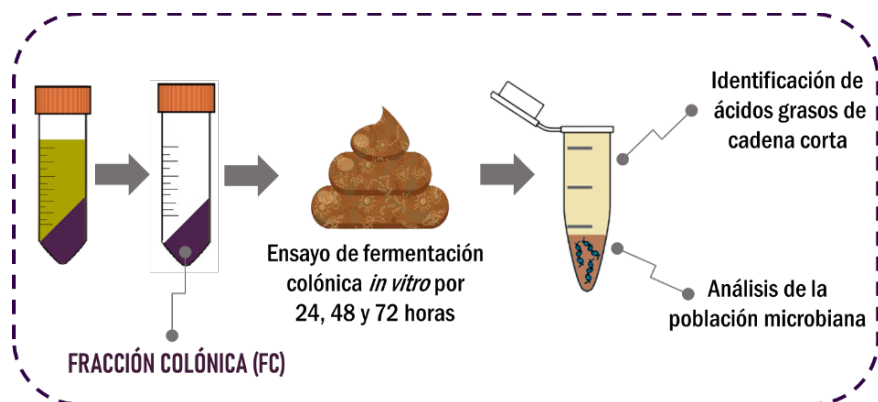


Figura 7. Esquema del ensayo de fermentación colónica *in vitro*.

4.2.9.1. Identificación y cuantificación de ácidos grasos de cadena corta

La producción de SCFAs en los productos fermentados se determinó cualitativa y cuantitativamente mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC, por sus siglas en inglés) Agilent serie 1200. Los mismos se separaron en una columna de intercambio iónico AMINEX HPX-87H (BioRad Labs, EE. UU.) y se detectaron a 214 nm con un detector UV. Se utilizó una fase móvil de H₂SO₄ 5 mM a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min a 60 °C durante 30 min. Los SCFAs se identificaron mediante la comparación de sus tiempos de retención con soluciones estándares de diferentes SCFAs con actividad biológica relevante: ácido láctico (5-200 mM), ácido acético (1-50 mM), ácido propiónico (2,5-30 mM) y ácido butírico (0,5-6 mM) (Bengoa et al., 2023; Medrano et al., 2020).

4.2.9.2. Análisis de la población microbiana

El análisis de la población microbiana se llevó a cabo en las muestras tomadas a 0 y 48 horas de fermentación. En primer lugar, se realizó una extracción de ADN utilizando un kit comercial (QIAamp PowerFecal) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) para determinar la concentración y calidad del ADN extraído de cada muestra. Para analizar la población microbiana en cada muestra, en primer lugar, a partir de dicho ADN extraído, se realizó una amplificación del gen 16S rRNA a través del ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Para ello, se utilizaron cebadores universales 518R (ATTACCGCGGCTGCTG) y 338F-GC (GCclamp-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG). El proceso de amplificación se realizó utilizando la polimerasa Taq Pegasus (PB L Biological Products, Argentina) siguiendo las

indicaciones del fabricante y utilizando un molde de ADN a una concentración de 0,5 ng/ μ L. La amplificación se llevó a cabo utilizando un termociclador T100 (laboratorios Bio-rad, Irvine, Estados Unidos). El programa de amplificación consistió en una etapa inicial de 5 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 60 °C y 20 segundos a 72 °C. Finalmente, se realizó una etapa de extensión de 1 min a 72 °C. Los productos de amplificación (7 μ L) fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% p/v con bromuro de etidio y revelado bajo luz ultravioleta (Bengoa et al., 2020). Finalmente, para analizar la diversidad microbiana a partir de los productos de amplificación obtenidos de la PCR se realizó un ensayo de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE, por sus siglas en inglés). Para ello, 10 μ L de los productos de PCR se sembraron en geles de poliacrilamida (15 × 20 × 0,075 cm) en buffer TAE (50X). Se utilizó un gradiente desnaturalizante de urea-formamida del 40 al 60% para lograr la separación óptima de las bandas. La electroforesis se llevó a cabo a 90 V durante 16 horas a 60 °C. Luego, los geles se tiñeron sumergiéndolos durante 30 min en una solución de Sybr-Gold (0,01%) en buffer TAE (1X) y se observaron bajo luz UV. El ADN extraído de cultivos puros de *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. kefir* y *Bifidobacterium adolescentis* se utilizaron como cepas de referencia para el análisis tanto de PCR como de DGGE. Los patrones de bandas obtenidos para cada muestra se compararon utilizando el programa Gel Compare II. El porcentaje de similitud entre las muestras se calculó utilizando el Coeficiente de Similitud de Dice y se construyeron los dendrogramas correspondientes mediante GIMP (Bengoa et al., 2020).

4.2.10. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron en triplicado. Los resultados se expresaron como medias \pm desviación estándar (n = 3). Los análisis se llevaron a cabo mediante análisis de varianza (ANOVA), y las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba de Tukey (p < 0,05). En estudios celulares, las diferencias estadísticas entre los valores medios de las muestras se determinaron mediante la prueba t (p < 0,05). Se utilizó el programa Infostat v. 2020 (Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina).

El análisis estadístico del estudio sensorial se realizó mediante ANOVA (teniendo en cuenta a los jueces, las muestras y las réplicas) utilizando el software XL-Stat 2021 (Addinsoft, NY). Para el análisis del perfil sensorial, se consideraron las interacciones evaluador*galleta y evaluador*réplica como factores de variación, determinando las puntuaciones medias y las diferencias significativas honestas (prueba de Tukey, $p \leq 0,05$). El análisis de componentes principales (PCA) de las puntuaciones medias se utilizó para ilustrar la relación entre variables y muestras. Para llevar a cabo el análisis sensorial de los consumidores, se empleó un análisis jerárquico de conglomerados para identificar grupos de consumidores en función de su agrado general por los productos. Los conglomerados se formaron utilizando el criterio de agregación de Ward y el cálculo de las distancias euclidianas entre los puntos de datos. Para determinar las diferencias en la distribución de frecuencia de género, edad, estado civil, educación y consumo de edulcorantes no nutritivos entre los conglomerados, se utilizó la prueba estadística de chi-cuadrado. Finalmente, se realizó un ANOVA en los datos de agrado general, considerando la muestra, el conglomerado y su interacción como factores de variación, determinando las puntuaciones medias y las diferencias significativas honestas (prueba de Tukey, $p \leq 0,05$). Se obtuvo la frecuencia de mención para el cuestionario CATA, seguida de la realización de la prueba de Cochran Q y la prueba de Bonferroni para identificar diferencias significativas en la selección de los términos. Para cada conglomerado, se realizó un análisis de correspondencia factorial (CA) en la tabla de contingencia obtenida considerando solo los términos significativos según la prueba de Cochran Q.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 5.1

Efectos de la incorporación de orujo de uva Tannat en la calidad sensorial y en las propiedades bioactivas de galletas



El objetivo del presente capítulo fue evaluar el potencial del orujo de uva Tannat en el desarrollo de galletas funcionales con un posible impacto positivo en la salud del consumidor. Para ello, se desarrollaron 5 formulaciones de galletas variando el contenido de polvo de orujo de uva Tannat y edulcorante. Se evaluaron las propiedades sensoriales de las galletas y se llevaron a cabo determinaciones de propiedades bioactivas *in vitro* de dichas formulaciones, incluyendo el contenido total de fenoles, la capacidad antioxidante mediante ABTS y ORAC-FL, y la actividad antidiabética y antiobesidad mediante la inhibición de la α -glucosidasa y la lipasa pancreática, respectivamente. Además, se llevó a cabo la identificación de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD-MS con el fin de determinar cuáles son los compuestos presentes en el orujo de uva Tannat y los compuestos que permanecen después de la cocción al ser incorporados en una galleta, con capacidad para promover la buena salud.

Los resultados de este estudio se encuentran publicados en la siguiente cita, la cual se presenta en el anexo de la tesis: Olt, V., Báez, J., Curbelo, R., Boido, E., Amarillo, M., Gámbaro, A., Alborés, S., García, N. G., Cesio, M. V., Heinzen, H., Dellacassa, E., Fernández-Fernández, A. M., & Medrano, A. (2023). Tannat grape pomace as an ingredient for potential functional biscuits: bioactive compound identification, *in vitro* bioactivity, food safety, and sensory evaluation. *Frontiers in Nutrition*. 10.3389/fnut.2023.1241105.

5.1.1. Desarrollo de galletas

Se desarrollaron 5 galletas con diferentes porcentajes de TGP (20%, 15% y 10% m/m de la masa total húmeda) y sucralosa (4%, 3%, 2% m/m de la masa total húmeda) como se muestra en la **Figura 8**.

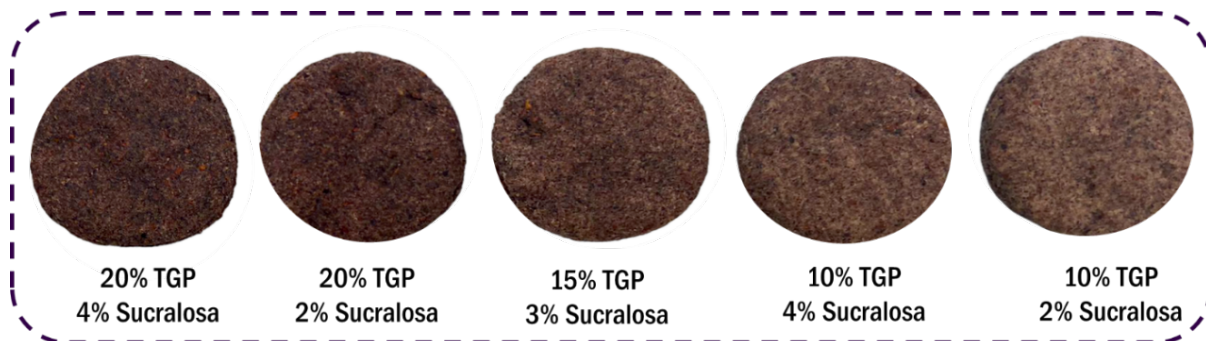


Figura 8. Galletas elaboradas con diferentes porcentajes de TGP (20%, 15% y 10% m/m de la masa total húmeda) y sucralosa (4%, 3%, 2% m/m de la masa total húmeda).

Las galletas con incorporación de 20% y 15% de orujo de uva se formularon de manera que puedan considerarse productos fuente de fibra, según lo estipulado en el decreto 402/12 de la normativa MERCOSUR (al menos 2,5 g de fibra por porción) (MERCOSUR, 2012). La estimación teórica de un posible rótulo nutricional para la galleta con 20% de TGP y 4% de sucralosa se muestra en la **Tabla 2**. La composición en macronutrientes de cada ingrediente para diseñar el rótulo se obtuvo a partir de su información nutricional y de la tabla de composición de alimentos de Uruguay (MTSS et al., 2002). Para el orujo de uva Tannat, se utilizó la información reportada en Olt et al. (2023).

Tabla 2. Posible rótulo nutricional de galletas con 20% orujo de uva Tannat y 4% de sucralosa.

INFORMACIÓN NUTRICIONAL		
Porción 30 g (4 galletas)		
	Cantidad por porción	%VD (*)
Valor energético (kcal)	123,1	6,2
Carbohidratos (g)	15,8	5,3
Proteínas (g)	3,0	4,1
Grasas totales (g)	5,3	9,7
Fibra dietaria (g)	3,8	15,3
Minerales totales (mg)	600	-

*Valores Diarios con base a una dieta de 2.000 kcal. Sus valores diarios pueden ser mayores o menores dependiendo de sus necesidades energéticas (MTSS et al., 2002).

5.1.2. Evaluación sensorial

La evaluación sensorial es esencial en el desarrollo de productos ya que la capacidad de un alimento para ejercer sus efectos beneficiosos se genera cuando es aceptado sensorialmente y así, consumido regularmente. En este contexto, a continuación, se presentan los resultados obtenidos en las etapas de la evaluación sensorial de las formulaciones de galletas con diferentes porcentajes de TGP.

5.1.2.1. Análisis del perfil sensorial con jueces semi entrenados

En la primera etapa de la evaluación sensorial, los perfiles sensoriales por parte de los jueces semi entrenados de las 5 formulaciones de galletas con diferentes porcentajes de TGP se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Promedio de las intensidades de los atributos sensoriales evaluados en las diferentes formulaciones de galletas en una escala de 10 cm (TGP% sucralosa%).

	20% 4%	20% 2%	15% 3%	10% 4%	10% 2%	Nivel de significancia
Intensidad de color	7,3 a	7,1 a	5,5 b	3,2 c	2,8 c	<0,0001
Dureza	6,0 a	5,7 a	3,9 b	2,0 c	1,8 c	<0,0001
Crujiente	6,4 a	5,4 a,b	4,4 b	2,2 c	2,0 c	<0,0001
Sequedad	5,7 a	4,8 a,b,c	5,2 a,b	3,2 c	3,6 b,c	0,0028
Arenosidad	5,7 a	5,0 a	4,6 a,b	3,8 a,b	2,6 b	0,0007
Dulzor	5,5 a	3,6 b	4,8 a,b	4,8 a	2,7 b	0,0066
Acidez	6,7 a	6,0 a	3,9 b	2,1 b,c	1,8 c	<0,0001
Sabor a uva	6,4 a	5,9 a,b	4,0 b, c	2,6 c	3,0 c	<0,0001
Sabor intenso	6,5 a	5,6 a,b	4,2 b,c	3,0 c,d	2,4 d	<0,0001
Retrogusto	3,9 a	2,9 a,b	2,6 a,b	2,2 a,b	1,6 b	0,0348
Persistencia de sabor	5,0 a	5,2 a,b	3,3 b,c	3,0 c	1,7 c	<0,0001

Las letras minúsculas en una fila indican diferencias significativas en el atributo evaluado en las diferentes galletas, según la prueba de Tukey.

Como se observa, la incorporación de TGP a las galletas aumentó significativamente ($p < 0,05$) la intensidad de la mayoría de los atributos sensoriales evaluados, donde las galletas con 20% de TGP fueron descritas como más duras, con un color más intenso,

con un sabor a uva más pronunciado, más ácidas, con una mayor intensidad y persistencia del sabor y con un retrogusto más pronunciado comparado con las galletas con 10% de TGP. Las galletas con un 15% de polvo de TGP mostraron un perfil sensorial intermedio entre las galletas con 20% y 10% de TGP. Estos resultados están en línea con los reportados en investigaciones previas donde productos horneados (grisines y panes) elaborados con un mayor porcentaje de orujo de uva mostraron mayor intensidad en ciertos atributos como la acidez y la astringencia, respecto a los elaborados con un menor porcentaje de dicho subproducto (Rainero et al., 2022; Sporn et al., 2017). Los resultados obtenidos, donde la incorporación del orujo de uva a las galletas afectó los atributos sensoriales en el producto desarrollado, son consistentes. Esto se debe a que el orujo de uva contiene ciertos componentes, como polifenoles y fibra, que pueden interactuar con otros ingredientes de las galletas, afectando así el sabor, aroma y textura del alimento en el cual fue incorporado (Iuga & Mironeasa, 2020).

En relación al porcentaje de edulcorante añadido, se observó que las galletas con un 4% de sucralosa fueron percibidas como significativamente más dulces ($p = 0,0066$) en comparación con las muestras que contenían la misma cantidad de TGP, pero 2% de edulcorante. La sucralosa parece mantener su intensidad de sabor dulce de manera constante, ya que no se vio afectada por los diferentes porcentajes de TGP incorporados en la galleta. Los diferentes porcentajes agregados de TGP no aportaron sabor dulce, lo que coincide en lo encontrado por Tolve et al. (2020), donde la adición de 10% de orujo de uva en pasta no causó ninguna diferencias significativas en el dulzor respecto a la pasta con 5% de orujo e incluso al producto sin la incorporación de subproducto.

Con el fin de agrupar las muestras visualmente e identificar las características sensoriales que tienen mayor intensidad en cada una de las muestras se realizó un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) como se muestra en la **Figura 9** con los datos sensoriales (**Tabla 3**) de las 5 formulaciones de galletas evaluadas.

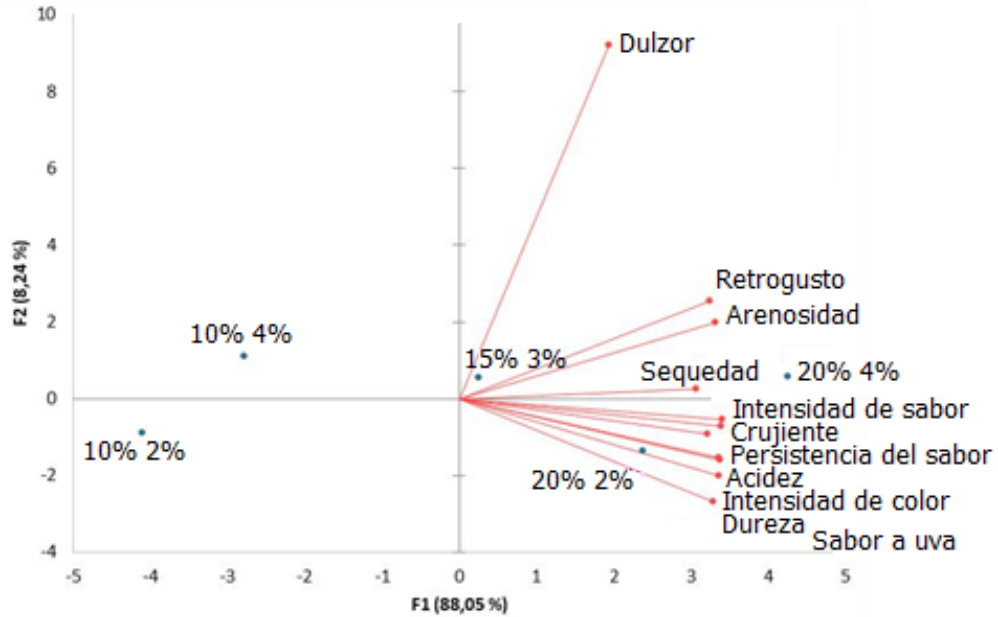


Figura 9. Análisis de componentes principales para los atributos sensoriales en las diferentes galletas evaluadas (TGP% sucralosa%). Proyección en los componentes 1 y 2.

Como se observa, las galletas con 20% TGP fueron las muestras que mostraron características sensoriales más intensas ya que para el lado donde se encuentran representadas dichas muestras se encuentran los vectores, a diferencia de las galletas con 10% de TGP que fueron las que mostraron menos intensidad en los atributos. La galleta con 15% mostro características sensoriales intermedias.

Las 3 formulaciones de galletas que mostraron mayores diferencias significativas en el análisis del perfil sensorial realizado por jueces semientrenados (20% TGP 4% sucralosa y 10% TGP 2% sucralosa), así como el punto intermedio (15% TGP 3% sucralosa) fueron las seleccionadas para realizar el análisis del perfil sensorial y aceptabilidad con consumidores.

5.1.2.2. Análisis del perfil sensorial y aceptabilidad con consumidores

Dentro de los 101 consumidores que evaluaron las galletas, se lograron identificar grupos diferentes (**Tabla 4**) según la aceptación hacia cada formulación considerando una puntuación mínima de 6,0 en una escala hedónica de 9 puntos, como la puntuación más baja aceptable para que un producto se considere comercialmente viable (Muñoz, 2002).

Los grupos 1, 2 y 3, estuvieron conformados por 37, 27 y 37 consumidores respectivamente.

Tabla 4. Puntuaciones de aceptación general con respecto al grupo de consumidor y a la formulación de galleta (TGP% sucralosa%).

Galleta	Grupo 1 n = 37	Grupo 2 n = 27	Grupo 3 n = 37	Nivel de significancia
10% 2%	6,5 b A	5,3 a B	3,7 b C	< 0,0001
15% 3%	6,6 b A	4,2 b B	5,0 a B	< 0,0001
20% 4%	7,3 a A	2,6 c C	5,6 a B	< 0,0001
Nivel de significancia	0,0091	< 0,0001	< 0,0001	

Las letras minúsculas en una columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey entre un mismo grupo para las diferentes formulaciones. Las letras mayúsculas en una fila indican diferencias significativas según la prueba de Tukey entre los diferentes grupos para una misma formulación.

Los consumidores del grupo 1 mostraron diferencias significativas ($p=0,0091$) en la aceptabilidad entre las 3 muestras, donde la galleta con mayor cantidad de TGP fue la más aceptada (7,3) sobre las otras dos muestras (6,5 de aceptación para la galleta 10% 2% y 6,6 de aceptación para la galleta 15% 3%). La galleta con 20% de TGP y 4% de sucralosa, mayor aceptada por este grupo, fue descrita como una galleta con dureza adecuada, textura suave, dulzura adecuada, sabor intenso, sabor ácido, sabor a uva y deliciosa. Los resultados indican que los participantes del grupo 1 podrían ser considerados potenciales consumidores de galletas con TGP, ya que mostraron niveles de aceptabilidad mayor a 6,0 en las 3 formulaciones de galletas. Según lo reportado, al comparar productos elaborados con un 20% de orujo de uva, se evidencia una variabilidad en los niveles de aceptación entre distintos productos. Los muffins fueron los menos aceptados, obteniendo una puntuación de 5,18 (Ortega-Heras et al., 2019) seguidos por cereales de desayuno con una aceptación de 6,45 (Oliveira et al., 2013). En contraste, las galletas con un 20% de orujo y un 30% de harina integral destacaron con una mayor aceptación, alcanzando una puntuación de 6,84 (Karnopp et al., 2015).

Por otro lado, los consumidores del grupo 2 manifestaron niveles de aceptabilidad bajos, situándose por debajo del límite comercial, para las 3 formulaciones de galletas evaluadas. En este grupo, la preferencia se inclinó hacia la galleta con la menor cantidad de TGP en comparación con las otras dos muestras ($p < 0,0001$). La aceptabilidad en este grupo disminuyó de manera significativa a medida que aumentaba la cantidad de TGP. Los consumidores de este grupo describieron a las galletas de manera predominante con atributos negativos, como poco dulce, seco, con regusto y sabor extraño, explicando así la baja aceptación atribuida por este grupo de consumidores a todas las galletas evaluadas. El grupo 2 no pueden considerarse como posibles consumidores de galletas con TGP, dada la baja aceptación.

Entre los consumidores del grupo 3, también se encontraron diferencias significativas para las muestras evaluadas ($p < 0,0001$). Aunque este grupo otorgó puntuaciones inferiores a 6,0 en términos de aceptabilidad, se identificó una mayor preferencia hacia aquellas que incorporaban una mayor proporción de TGP en comparación con la muestra que contenía un 10% de TGP. En consecuencia, este grupo podría considerarse como potenciales consumidores de galletas con el mayor porcentaje de TGP. Entre los términos más frecuentemente empleados por los consumidores del grupo 3 se encuentran color adecuado, dureza adecuada, ligeramente dulce, sabor suave, sabor ácido, sabor a uva y sabor extraño.

Cabe destacar que, debido al bajo número de consumidores en cada grupo, los resultados pueden tener limitaciones. Al considerar a todos los grupos como uno solo, la aceptación general fue de 5,0, 5,3 y 5,2 para las galletas al 20% 4%, 15% 3% y 10% 2%, respectivamente. La aceptabilidad promedio menor a 6,0 de cada formulación concuerda con los resultados obtenidos Fernández-Fernández et al. (2022) donde galletas con cáscara de uva Tannat mostraron una aceptabilidad baja (5,1). Del mismo modo, Kuchtová et al. (2018) explican la baja aceptabilidad de galletas con orujo de uva debido a la presencia de sabores astringentes y amargos asociados con este subproducto.

5.1.4. Contenido de Polifenoles Totales y propiedades bioactivas

Se determinó el Contenido de Polifenoles Totales en las galletas desarrolladas, y se evaluaron sus propiedades bioactivas *in vitro*, incluyendo la capacidad antioxidante mediante los métodos de ABTS y ORAC-FL, la actividad antidiabética a través de la inhibición de la α -glucosidasa, y la actividad antiobesidad mediante la inhibición de la lipasa pancreática.

5.1.4.1. Contenido de Polifenoles Totales y capacidad antioxidante

Los polifenoles son compuestos que exhiben propiedades antioxidantes, aunque esta propiedad bioactiva puede verse afectada cuando dichos compuestos se incorporan a un alimento y son sometidos al procesamiento (Dini & Grumetto, 2022). Por lo tanto, es crucial evaluar si las galletas con el agregado de TGP mantienen los compuestos fenólicos con capacidad antioxidante luego del proceso de horneado. En la **Figura 10** se observa el contenido de polifenoles totales (TPC), mientras que en la **Figura 11** la capacidad antioxidante medida por ABTS (a) y ORAC-FL (b) en las diferentes formulaciones de galletas.

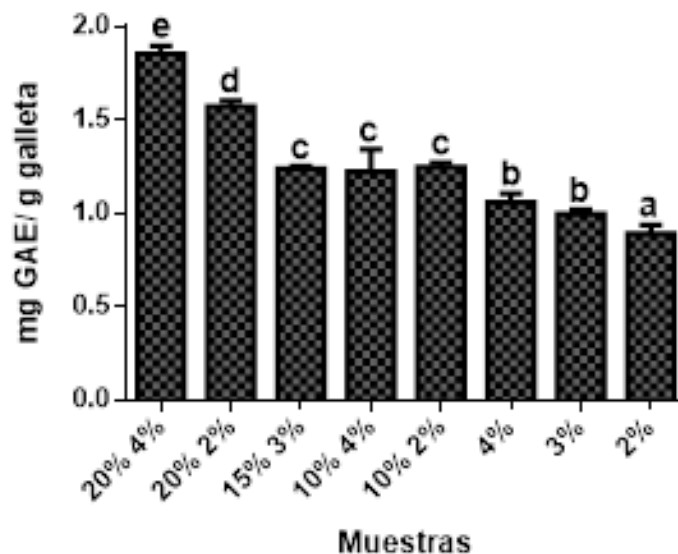


Figura 10. Contenido de polifenoles totales (TPC) de las diferentes formulaciones de galletas (TGP% sucralosa%). Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Letras diferentes denotan diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$) entre las diferentes muestras.

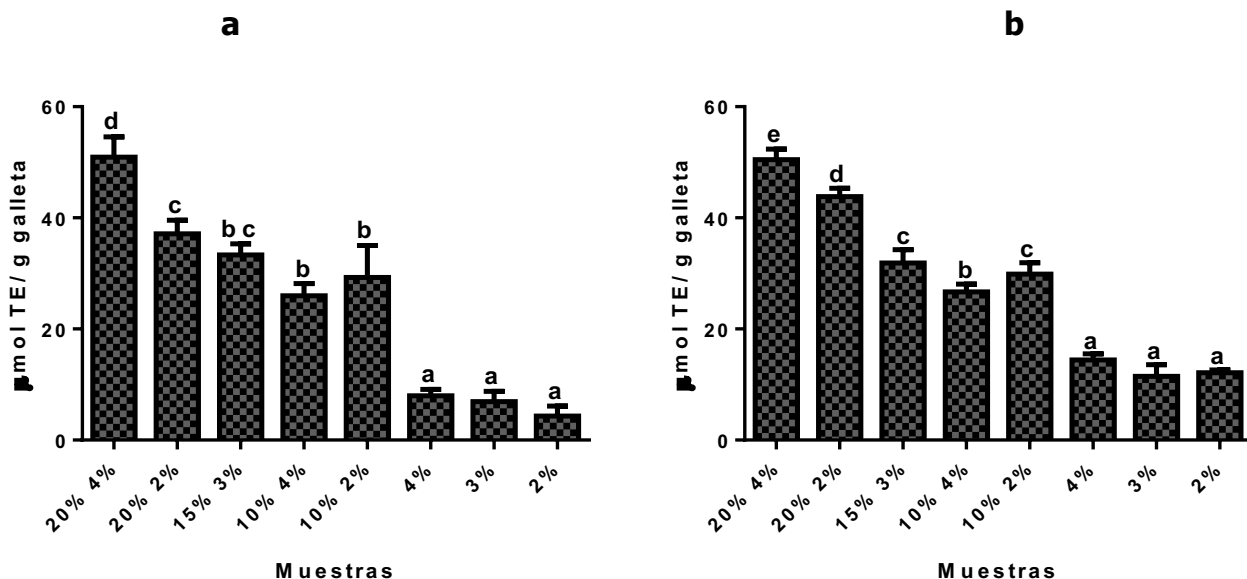


Figura 11. Capacidad antioxidante medidos por ABTS (a) y ORAC-FL (b) de las diferentes formulaciones de galletas (TGP% sucralosa%). Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Letras diferentes denotan diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$) entre las diferentes muestras.

Los resultados muestran que tanto el TPC (**Figura 10**), como la capacidad antioxidante medida por ambos métodos (**Figura 11**), aumentaron en las galletas con sustitución de harina de trigo por TGP en comparación con sus galletas controles. Específicamente, la galleta con un mayor porcentaje de TGP y sucralosa (20% 4%) mostró los valores más altos de TPC y capacidad antioxidante ($p < 0,05$). Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Theagarajan et al. (2019) y Fernández-Fernández et al. (2022) donde galletas con un 6% de orujo de uva y 20% de cáscara de uva, respectivamente, mostraron un mayor TPC y capacidad antioxidante en comparación con sus galletas controles sin el agregado de orujo. A su vez, en el estudio realizado por Karnopp et al. (2015), se reportó un contenido de polifenoles totales de $0,24 \pm 0,08$ mg GAE/g en galletas que contenían un 20% de orujo proveniente de uva tinta labrusca (*Vitis labrusca*) y 30% de harina integral. Estos resultados contrastan con los obtenidos en nuestra investigación, donde observamos un TPC significativamente superior de $1,86 \pm 0,04$ mg GAE/g en las galletas con la misma proporción de subproducto. En relación con la

capacidad antioxidante medida por ABTS, también encontramos discrepancias en comparación con nuestro trabajo. En un estudio utilizando un 10% de orujo de uva de la variedad *Vitis vinifera* cv. Cabernet en grisines, se registró una capacidad antioxidante por ABTS de $11,39 \pm 0,27 \mu\text{mol TE/g}$ grisín (Rainero et al., 2022). En contraste, nuestras galletas, con la misma proporción de subproducto, exhibieron una capacidad antioxidante significativamente superior, registrando $26,697 \pm 1,364 \mu\text{mol TE/g}$ muestra (10% 4%).

En conjunto, se evidencia que la variabilidad en la composición de ingredientes de los alimentos o las diferencias en la variedad de la uva pueden tener un impacto sustancial en la cantidad de polifenoles, lo que a su vez influye en la capacidad antioxidante. Nuestros resultados indican que los compuestos fenólicos derivados del orujo de uva Tannat conservan una mayor capacidad antioxidante en comparación con otras variedades. Asimismo, se destaca que los compuestos fenólicos poseen actividad antioxidante con mecanismos de acción ET y HAT luego del proceso de horneado a una temperatura elevada de $180 \text{ }^\circ\text{C}$ al incorporarse en las galletas.

Con el objetivo de comprender cómo varía el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante en función del porcentaje de TGP y sucralosa incorporados en las galletas se realizaron gráficas de superficie de respuesta las cuales se muestran en la **Figura 12**.

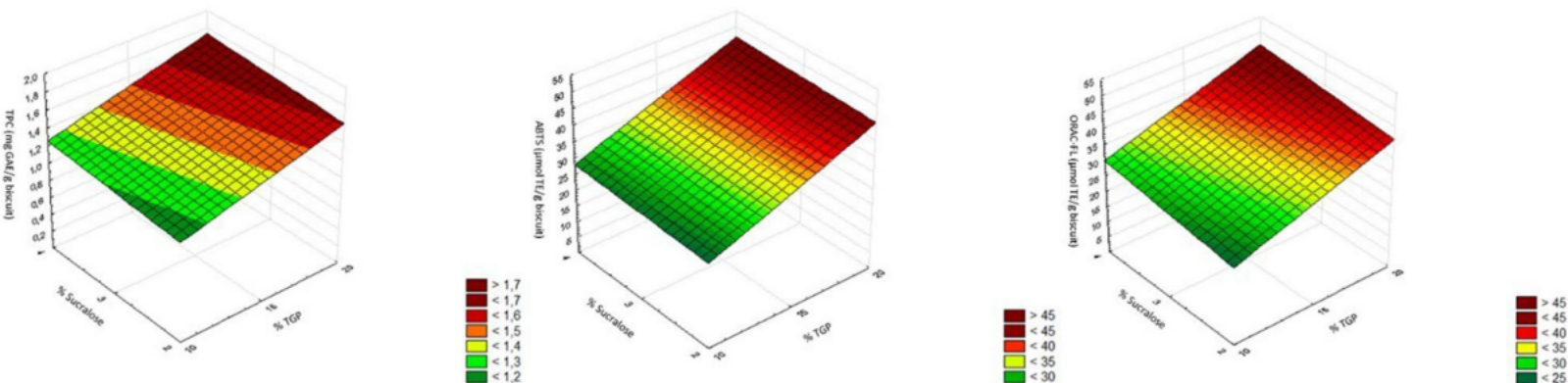


Figura 12. Gráficos de superficie de respuesta de las determinaciones de TPC, ABTS y ORAC-FL.

Como se observa, la relación entre el porcentaje de TGP y el de sucralosa incorporados en las galletas presentó una asociación lineal con las variables de respuesta (TPC, ORAC-FL y ABTS). El análisis de regresión múltiple ajustado a la Ecuación 1 (sección 4.2.2) resultó en las siguientes tres ecuaciones:

$$\text{TPC} = 1.38 + 0.24 * \text{TGP} \quad (6)$$

$$\text{ABTS} = 35.02 + 9.43 * \text{TGP} \quad (7)$$

$$\text{ORAC-FL} = 34.76 + 8.19 * \text{TGP} \quad (8)$$

Los coeficientes no significativos ($p > 0,05$) fueron excluidos del análisis, lo que muestra que las variables de respuesta dependían únicamente del factor %TGP y fueron influenciadas positivamente por este factor.

Los valores de R^2 indicaron que la variabilidad en TPC, ABTS y ORAC-FL se explica de manera deficiente por el ajuste del modelo debido a los valores bajos ($< 80\%$). La mayor concentración de TPC y capacidad antioxidante correspondió a la galleta con la mayor sustitución de harina de trigo por TGP (20%).

Tabla 5. Resultados del análisis de regresión múltiple para las variables de respuesta TPC, ABTS y ORAC-FL.

Coeficientes	TPC	ABTS	ORAC-FL
Constante	1,38	35,02	34,76
%TGP	0,24	9,43	8,19
%sucralosa	-	-	-
TGP%*sucralosa%	-	-	-
R^2 (%)	61,49	77,10	66,22
R^2 ajustado	53,79	72,53	59,46
p-valor	0,037	0,009	0,026

5.1.4.2. Capacidad antidiabética y antiobesidad

La utilización de compuestos inhibidores enzimáticos se ha convertido en una herramienta terapéutica crucial para abordar diversos trastornos. En el contexto de la obesidad, el

enfoque principal se centra en la inhibición de la lipasa pancreática, la enzima responsable de la hidrólisis del 50-70% de los lípidos ingeridos. En el caso del control de la diabetes, se destaca la inhibición de la α -glucosidasa como una herramienta para controlar los niveles de glucosa posprandial (Iftikhar et al., 2020; Martinez-Gonzalez, Alvarez-Parrilla, et al., 2017). Dentro del grupo de compuestos capaces de inhibir enzimas vinculadas al desarrollo de trastornos metabólicos se incluyen los polifenoles (Dwibedi et al., 2022) como aquellos presentes en el orujo de uva. En línea con esta afirmación, en la **Figura 13** se observa que el contenido de TGP en las galletas mostró una influencia positiva en la inhibición de la α -glucosidasa y de la lipasa pancreática.

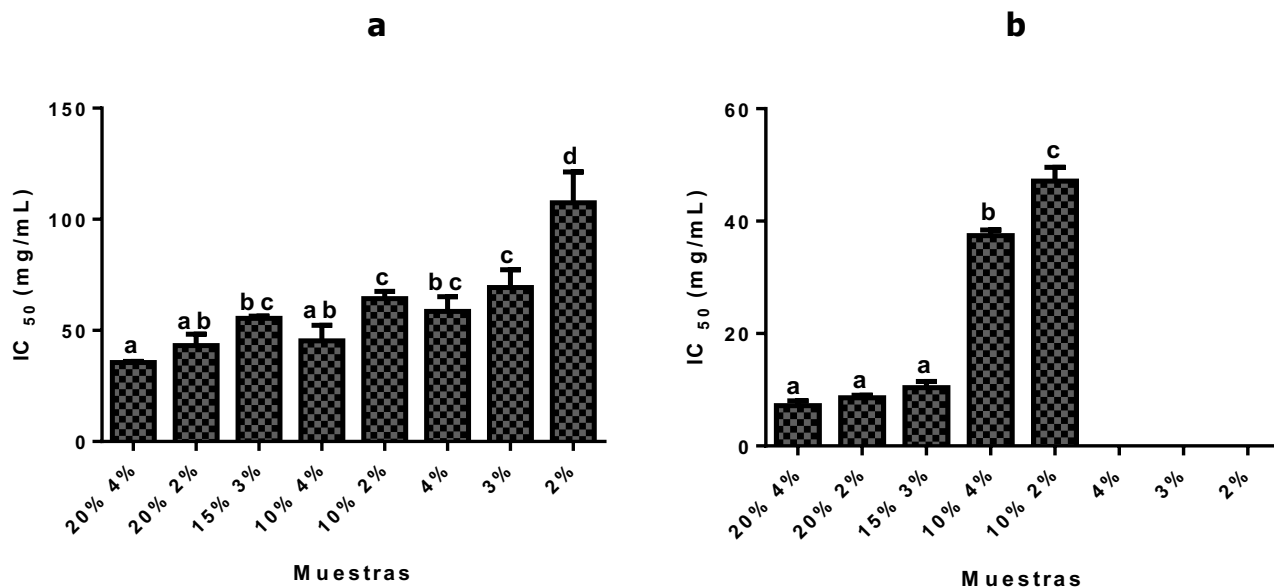


Figura 13. Actividad inhibidora de la α -glucosidasa (a) y la lipasa pancreática (b) de las formulaciones de galletas (TGP% sucralosa%). Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Letras diferentes denotan diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$) entre las diferentes muestras.

Específicamente, la mayor inhibición de la α -glucosidasa ($p < 0,05$) fue ocasionada por la galleta con la mayor sustitución (20%) de harina de trigo por TGP en las galletas (**Figura 13a**). Estudios previos respaldan estos hallazgos, donde extractos de uvas tintas demostraron un potencial inhibición de la α -glucosidasa en relación con un mayor contenido de polifenoles totales (Dudoit et al., 2020). Es importante destacar que, incluso

a concentraciones iguales o más bajas, los extractos de uva reportados por Dudoit et al. (2020) mostraron una eficiencia superior en comparación con el inhibidor sintético acarbosa, que presenta múltiples efectos secundarios.

En relación con la inhibición de la lipasa pancreática, se observó que las galletas con un 20% y 15% de TGP fueron las que exhibieron la capacidad inhibitoria más destacada (**Figura 13b**).

Aunque existen investigaciones que reportan una mayor capacidad inhibitoria de la α -glucosidasa (IC_{50} de 0,55 mg/mL según Iriondo-DeHond et al. (2020); IC_{50} de 1,63 mg/mL según Hogan et al. (2010)) en extractos obtenidos de orujo de uva de variedades no Tannat, y una mayor capacidad de inhibición de la lipasa pancreática (IC_{50} de 2,431 mg/mL según Fernández-Fernández et al. (2019) en extractos de cáscara de uva Tannat en comparación con nuestros resultados, hasta donde tenemos conocimiento, esta es la primera vez que se informa sobre la capacidad de la galletas con orujo de uva Tannat para inhibir dichas enzimas. Considerando que los extractos mencionados anteriormente representan concentrados de compuestos fenólicos, es esencial tener en cuenta que, en productos alimenticios como las galletas, los polifenoles interactúan con una variedad de ingredientes. Estos compuestos fenólicos pueden interactuar con los macro componentes de la matriz alimentaria, incluyendo lípidos, proteínas y carbohidratos, alterando su estructura y generando cambios subsiguientes en su bioactividad (Jakobek, 2015). Esta interacción puede obstaculizar la capacidad de los polifenoles para interactuar eficazmente con las enzimas y, por ende, modula su efecto inhibitorio. En este sentido, en línea con nuestros hallazgos, se ha reportado una mayor inhibición de la α -glucosidasa en pan fortificado con cáscara de uva blanca en comparación con el alimento no enriquecido (Lavelli et al., 2016). Igualmente, los autores encontraron que el aumento de la inhibición fue menor de lo esperado (basándose en la cantidad de cáscara de uva añadida), probablemente debido a la formación de complejos de proantocianidina/proteína con componentes de la matriz alimenticia que disminuyeron la solubilidad, reduciendo así su accesibilidad para las determinaciones de bioactividad. Además, sugieren que la temperatura de horneado podría haber causado cambios en

esos complejos, así como la degradación parcial de proantocianidinas (Lavelli et al., 2016). Asimismo, en el contexto de alimentos fortificados con diversas matrices de compuestos fenólicos, se observó que el enriquecimiento del pan de centeno con un 3% de polvo de bayas de Saskatoon aumentó la actividad inhibitoria contra la α -glucosidasa y la lipasa pancreática en comparación con el pan de control (Lachowicz et al., 2020). El kéfir de leche fortificado con un extracto obtenido mediante extracción asistida por ultrasonido a partir de la cáscara del orujo de la variedad de uva tinta Sangiovese mostró una mayor inhibición de la α -glucosidasa y la lipasa pancreática en comparación con el kéfir de control (Carullo et al., 2020).

Estos resultados son prometedores en el contexto del desarrollo de alimentos funcionales con propiedades terapéuticas beneficiosas.

Al analizar la composición fenólica en la galleta con 20% de TGP (como se detalla posteriormente en la **Tabla 6**) se puede establecer una asociación entre las estructuras de dichos compuestos y las capacidades para inhibir la α -glucosidasa y la lipasa pancreática. Los flavanoles monoméricos, como la (-)-epicatequina y la catequina, como los encontrados en la galleta, han demostrado tener actividad inhibitoria sobre la α -glucosidasa (Dudoit et al., 2020). Estructuralmente, los grupos fenoles de los polifenoles cumplen un rol importante a la hora de inhibir dicha enzima. Se ha observado que es necesaria una asociación entre al menos dos moléculas de fenol simple para unirse al sitio activo de la α -glucosidasa y poder inhibirla (Aleixandre et al., 2022). En relación con la lipasa pancreática, se ha observado que los compuestos capaces de inhibirla ejercen su efecto mediante la unión a sitios específicos o cerca de su sitio activo. Esta interacción afecta tanto su actividad enzimática como la unión al sustrato, manifestándose de manera competitiva y no competitiva (Martinez-Gonzalez, Alvarez-Parrilla, et al., 2017). Dentro de estos compuestos, se ha informado que las proantocianidinas inhiben de manera no competitiva la lipasa pancreática, induciendo su agregación y la subsiguiente estabilización de los agregados (Wang et al., 2014). A su vez, la quercetina, como la encontrada en la galleta, ha demostrado ser un inhibidor fuerte de la lipasa pancreática

comparado con otros compuestos fenólicos (Martinez-Gonzalez, Alvarez-Parrilla, et al., 2017).

5.1.5. Identificación de compuestos fenólicos

Con el fin de evaluar el impacto de la incorporación de los compuestos fenólicos provenientes del orujo de uva Tannat en las galletas y determinar posibles compuestos responsables de otorgar a las galletas las propiedades bioactivas previamente mencionadas, se llevó a cabo la identificación de los compuestos fenólicos presentes en la formulación de galleta 20% 4%, así como en el orujo de uva Tannat como tal (**Tabla 6**).

Como se logra observar, los compuestos fenólicos con áreas predominantes en la galleta con TGP fueron la malvidina-3-O-(6'-p-cumaroil)glucósido, la (+)-catequina, la malvidina-3-O-glucósido (204,82 µg/ g galleta), la (-)-epicatequina, el dímero B3 de procianidina y la quercetina-3-O-glucósido, en orden descendente, sin mostrar presencia de ácidos fenólicos detectables. Por otro lado, al analizar el TGP, se identificaron como compuestos mayoritarios la malvidina-3-O-(6'-p-cumaroil)glucósido, el trímero de procianidina (Rt 10,608), la malvidina-3-O-glucósido (4288,05 µg/ g orujo), la (-)-epicatequina y la p-cumaroil hexosa, también en orden descendente.

Lo que respecta al TGP, el perfil de flavanoles y flavonoles es similar a los encontrados en cáscaras y semillas de uva Tannat que no han pasado por el proceso de vinificación, donde en las semillas se encontraron niveles más altos y mayor diversidad de procianidinas que en las cáscaras (Boido et al., 2011), lo que sugiere que estos compuestos están principalmente presentes en las semillas. En cuanto al perfil de antocianinas, el mismo coincide en parte con el perfil encontrado en la cáscara de TGP, donde también se detectó la presencia de petunidina-3-O-(6'-acetil)glucósido, petunidina-3-O-(6'-p-cumaroil)glucósido, peonidina-3-O-(6'-acetil)glucósido, peonidina-3-O-(6'-p-cumaroil)glucósido, malvidina-3-O-(6'-acetil)glucósido, delfinidina-3-O-(6'-p-cumaroil)glucósido, cianidina-3-O-(6'-p-cumaroil)glucósido. Igualmente no detectaron presencia de malvidina-3-O-glucósido, petunidina-3-O-glucósido, peonidina-3-O-glucósido y delfinidina-3-O-glucósido (Fernández-Fernández et al., 2022) . Por otro lado,

en el estudio de Favre et al. (2019) al igual que en nuestra investigación, se encontró que la malvidina-3-O-glucósido fue la antocianina más abundante identificada en el orujo de uva Tannat, con una concentración de 3830 $\mu\text{g/g}$ de orujo. En otras variedades de orujo de uva tinta, si bien también se ha reportado como la antocianina mayoritaria, se ha encontrado en concentraciones menores. Por ejemplo, en el orujo de uva Cabernet Sauvignon se encontró una concentración de malvidina-3-O-glucósido de 158 $\mu\text{g/g}$ de orujo, mientras que en el orujo de uva Negroamaro se registró una concentración de 382 $\mu\text{g/g}$ de orujo (Negro et al., 2021). Se ha informado que el consumo de malvidina-3-O-glucósido puede tener un efecto positivo en diversas patologías (Merecz-Sadowska et al., 2023). Dado que el orujo de uva Tannat contiene una concentración mayor de dicha antocianina en comparación con otras variedades, su consumo podría beneficiar la salud del consumidor.

En la investigación de Favre et al. (2019), al igual que en la nuestra, se utilizó la malvidina-3-O-glucósido como estándar para informar las concentraciones de los compuestos identificados, lo que permite una comparación entre las concentraciones de los compuestos identificados en ambos estudios. No obstante, no se observó el mismo perfil de compuestos mayoritarios. Por ejemplo, no detectaron la presencia de epicatequina, trímero de procianidina y p-cumaroil-hexosa. Además, la concentración de malvidina-3-O-(6'-p-cumaroil)glucósido encontrada en su estudio fue de 21 $\mu\text{g/g}$ de orujo, mientras que en el nuestro fue de 11.017 $\mu\text{g/g}$ de orujo. Nuestra investigación también reveló una concentración total de compuestos fenólicos de 53.525 $\mu\text{g/g}$ de orujo, mayor en comparación con los 10.899 $\mu\text{g/g}$ de orujo reportados por ellos. Estos resultados podrían sugerir que si bien el orujo utilizado en ambos estudios proviene de la misma variedad de uva (Tannat), factores como el tiempo de contacto del mismo con el mosto, así como su procesamiento posterior, pueden influir en el perfil cualitativo y cuantitativo de los compuestos fenólicos (Almanza-Oliveros et al., 2024; Favre et al., 2019). Este hallazgo resalta la importancia de considerar no solo la variedad de uva, sino también los procesos específicos de vinificación y manejos posteriores para optimizar el contenido nutricional y potencialmente mejorar su valor como ingrediente.

Tabla 6. Datos sobre la identificación de compuestos fenólicos presentes en el orujo (TGP) y en la galleta con 20% de orujo y 4% de sucralosa. En la galleta control con 4% de sucralosa no se identificaron compuestos fenólicos (datos no mostrados).

Compuesto	TGP		Galleta		TGP	Galleta		
	Rt (min)	Área	20% Rt (min)	4% Área	µg/g TGP*	20% µg/g	4% galleta*	
Cromatograma 280 nm	Ácidos fenólicos	Ácido cis-caftarico	6,496	34450			167,32	
		Ácido trans-caftarico	6,893	90891			441,45	
		Ácido protocatecuico	8,730	225597			1095,70	
		Ácido trans-coutárico	12,313	265757			1290,75	
		p-coumaroil hexosa	12,457	573977			2787,75	
	Flavan-3-oles	Trimero de procianidina C2	4,628	39983	4,376	974	194,19	4,72
		Dimero de procianidina B1	7,453	181179	7,040	3393	879,97	16,45
		Dimero de procianidina B3	8,022	303632	7,562	26005	1474,71	126,05
		(+)-Catequina	8,306	436692	7,905	53780	2120,97	260,68
		Trimero de procianidina	9,104	199322	8,852	7084	968,09	34,34
		Trimero de procianidina	10,608	1127900	10,315	6897	5478,10	33,43
		Dimero de procianidina B4	11,459	328747	10,862	2461	1596,69	11,93
		Dimero de procianidina B6	11,832	204148	11,617	15877	991,53	76,96
		(-)-Epicatequina	12,457	839734	11,835	32999	4078,50	159,95
		Dimero de procianidina galoilado	15,757	107028	14,862	1430	519,82	6,93
Flavonoles	Trimero de procianidina	16,024	89969			436,97		
	Trimero de procianidina	16,324	341893			1660,54		
	Dimero de procianidina B2	17,158	161716			785,44		
	Dimero de procianidina galoilado	17,579	302107			1467,30		
	Dimero de procianidina B7	22,827	200876			975,63		
	Miricetina-3-O-galactósido	19,665	79965			388,38		
	Miricetina-3-O-glucósido	21,814	31333			152,18		
Flavonoles	Quercetina-3-O-galactósido	22,689	65749			319,34		
	Quercetina-3-O-glucósido	23,466	162693	23,165	17380	790,18	84,25	
	Siringetina-3-O-glucósido	26,790	71502			347,28		
	Quercetina-7-O-neohesperidosido	28,236	160861	28,013	4425	781,29	21,45	
	Quercetina (aglicona)	35,226	57127	34,083	9259	277,46	44,88	
Cromatograma 520 nm	Antocianinas	Delfinidina-3-O-glucósido			14,024	2095		10,15
		Petunidina-3-O-glucósido	17,573	52866	17,493	9506	256,76	46,08
		Peonidina-3-O-glucósido	19,744	74672	19,478	2392	362,67	11,59
		Malvidina-3-O-glucósido	20,804	882877	20,724	42255	4288,05	204,82
		Petunidina-3-O-(6'-acetil)glucósido	26,547	34547	26,743	1275	167,79	6,18
		Peonidina-3-O-(6'-acetil)glucósido	28,848	13166			63,95	
		Malvidina-3-O-(6'-acetil)glucósido	29,545	211121	29,777	4879	1025,39	23,65
		Delfinidina-3-O-(6'-p-coumaroil)glucósido	30,385	72350	30,696	4851	351,40	23,51
		Malvidina-3-O-(6'-cafeoil)glucósido	32,285	192783	32,599	3931	936,33	19,05
		Cianidina-3-O-(6'-p-coumaroil)glucósido	32,677	28817	32,893	1373	139,96	6,66

Petunidina-3-O-(6'-p-coumaroil)glucósido	33,362	308975	33,699	9771	1500,66	47,36
Peonidina-3-O-(6'-p-coumaroil)glucósido	35,785	195123	36,016	5279	947,69	25,59
Malvidina-3-O-(6'-p-coumaroil)glucósido	36,079	2268418	36,458	67424	11.017,48	326,82
Σ					53.525,69	1.633,48

*Determinado en base a una curva de calibración de Malvidina-3-O-glucósido

Respecto al impacto de la incorporación de los compuestos fenólicos provenientes del orujo de uva Tannat en la galleta, los resultados presentados en la **Tabla 6** revelan que todos los compuestos fenólicos identificados experimentaron cierta pérdida en la galleta (cerca del 84% de pérdida calculada mediante relaciones de área), ya sea por el proceso de horneado o por la unión a las macromoléculas que constituyen los ingredientes de la galleta. Varios estudios han documentado una disminución en la cantidad de compuestos fenólicos totales después de procesos térmicos como el horneado. Un ejemplo de esto es la berenjena, que ha mostrado una pérdida de un 64% de sus compuestos fenólicos luego de este proceso (Martini et al., 2021).

En el caso de las galletas, específicamente los ácidos fenólicos no fueron detectados y el trímero de procianidina ($R_t = 10,3 - 10,6$ min) mostró la mayor pérdida en la galleta. Ya se ha reportado la inestabilidad particular a los tratamientos térmicos de las procianidinas con la mayoría de los estudios publicados registrando una reducción en su contenido luego de la cocción a temperaturas mayores a los 100 °C (Martini et al., 2021; Yu & Ahmedna, 2013). La presencia de antocianinas en las galletas resultó en una pérdida de aproximadamente el 82%. Se ha informado que las antocianinas son compuestos altamente sensibles a cualquier tratamiento térmico, y su estabilidad está inversamente relacionada con la temperatura (Martini et al., 2021). La estructura química de las antocianinas puede haber cambiado debido a la temperatura de horneado al sufrir escisión, polimerización, glicosilación y/o ataque nucleofílico del agua (Tena & Asuero, 2020). Durante el tratamiento térmico, las antocianinas pueden ser transformadas en glucósidos de chalcona y luego hidrolizadas para liberar chalconas, que se escinden para formar diversos productos, incluidos aldehídos y ácidos (Ou et al., 2019).

En contraste, respecto a los compuestos encontrados en la galleta, la petunidina-3-O-glucósido, la aglicona de quercetina, la (+)-catequina, la quercetina-3-O-glucósido y el

dímero B3 de procianidina exhibieron la menor pérdida durante el proceso de horneado. La menor pérdida de dímero B3 de procianidina y (+)-catequina puede explicarse por su liberación con la degradación/hidrólisis del trímero de procianidina, el cual disminuye (Dwibedi et al., 2022). A su vez, la quercetina ha demostrado ser un compuesto altamente estable, ya que incluso a una temperatura de 100 °C, se conserva un 75% de su contenido original (Ou et al., 2019).

En resumen, los resultados obtenidos nos permiten hipotetizar que los compuestos fenólicos inicialmente presentes en TGP podrían haber sufrido modificaciones en su estructura química debido a la temperatura de horneado o podrían haber terminado formando enlaces más fuertes con los ingredientes de la galleta durante el horneado, lo que podría haber dificultado la extracción de los compuestos fenólicos durante la extracción para el análisis (Jakobek, 2015; Lavelli et al., 2016). Los compuestos restantes pueden ser responsables de las capacidades antioxidantes, de la inhibición de la α -glucosidasa y de la lipasa pancreática exhibidas por las galletas. En particular, los compuestos fenólicos con anillos B, como los identificados en la galleta de TGP, presentan inhibición de enzimas de hidrólisis de carbohidratos (Dwibedi et al., 2022). Además, las proantocianidinas, que se encuentran principalmente en las semillas de uva, poseen muchas propiedades bioactivas (Unusan, 2020).

Hasta donde llega nuestro conocimiento, este es el primer estudio en el que se evidencia la pérdida de compuestos fenólicos durante el horneado de una galleta con orujo de uva tinta mediante un método analítico avanzado como HPLC-DAD-MS.

5.1.6. Conclusión parcial

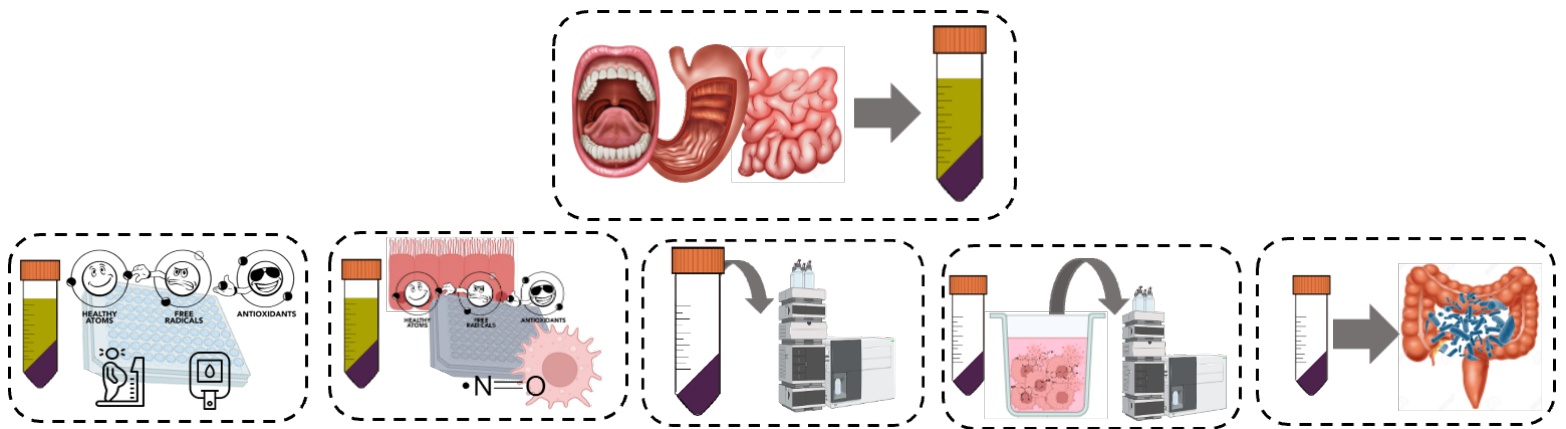
Se desarrollaron galletas potencialmente funcionales con las alegaciones de “fuente de fibra” y “sin azúcares agregados”, variando el contenido de orujo de uva Tannat (TGP) y el edulcorante sucralosa. Las galletas con mayor cantidad de TGP (20%) y sucralosa (4%) exhibieron la capacidad antioxidante, la inhibición de la α -glucosidasa y la lipasa pancreática más elevada. Además, dicha galleta recibió una aceptación mayor a 6,0 en la aceptación sensorial por parte de 37 de los 101 consumidores evaluados.

Este estudio, hasta donde alcanza nuestro conocimiento, es el primer análisis en el que los compuestos fenólicos presentes en el TGP y en las galletas con 20% de TGP y 4% de sucralosa fueron identificados mediante HPLC-DAD-MS, observando una degradación de dichos compuestos luego del horneado. Igualmente, los compuestos fenólicos que permanecieron en el alimento luego del horneado se sugieren como compuestos con capacidad para otorgar beneficios saludables a los consumidores.

En conclusión, los resultados destacan el potencial de las galletas de TGP como alimentos funcionales para impactar positivamente en la salud y en el ambiente. Para continuar con el desarrollo de los alimentos funcionales se debe continuar con los estudios de bioaccesibilidad y biodisponibilidad.

CAPÍTULO 5.2

Impacto del proceso de digestión gastrointestinal en la composición de compuestos fenólicos y en las propiedades promotoras de la salud del orujo de uva Tannat y sus galletas



El presente capítulo proporciona estudios sobre la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos bioactivos presentes en las galletas presentadas en el capítulo 5.1. Para dicho propósito, se realizó una digestión gastrointestinal *in vitro* de las galletas, lo que permitió obtener 2 fracciones por cada galleta: la Fracción Bioaccesible (FB) y la Fracción Colónica (FC), tal como se esquematiza en la **Figura 14**.

Con el fin de evaluar si en las galletas, luego de la digestión gastrointestinal *in vitro*, se mantiene el contenido total de fenoles y las propiedades bioactivas estudiadas en el capítulo anterior (capacidad antioxidante, antidiabética y antiobesidad), se realizaron determinaciones en ambas fracciones (FB y FC) de dichas propiedades bioactivas. En la FC, específicamente, se procedió a la identificación de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD-MS. Adicionalmente, en ambas fracciones (FB y FC), se realizaron determinaciones de la capacidad antioxidante y antiinflamatoria en células intestinales y células del sistema inmune, respectivamente. Además, con el propósito de identificar qué compuestos podrían estar potencialmente biodisponibles en la FC, se llevó a cabo un ensayo de captación de compuestos en células intestinales. Asimismo, en la FC se evaluó el impacto que podría generar la microbiota intestinal una vez consumidas dichas galletas.

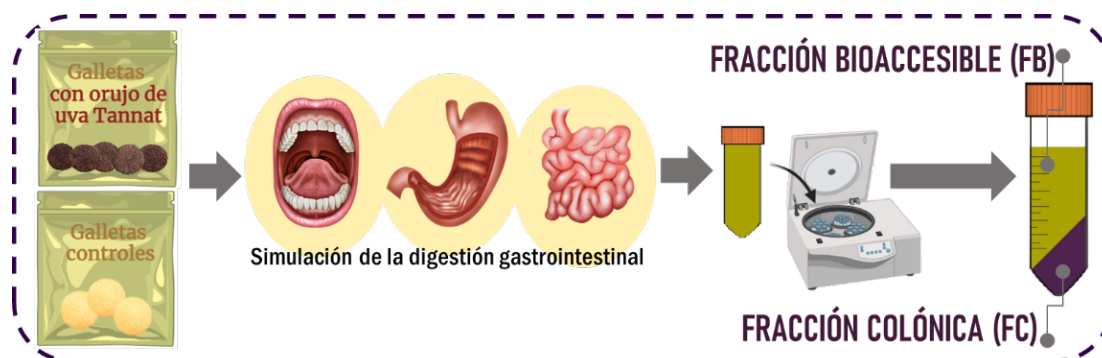


Figura 14. Esquema de la obtención de las Fracciones Bioaccesibles (FB) y Fracciones Colónicas (FC) luego de la simulación *in vitro* de la digestión gastrointestinal de las galletas. Se obtuvo una FB y una FC por cada galleta digerida.

5.2.1. Identificación de compuestos fenólicos en las Fracciones Colónicas (FC)

La composición en compuestos fenólicos en la Fracción Colónica (FC) del orujo de uva Tannat (TGP) (FC TGP) y en la FC de la galleta con 20% de TGP y 4% de sucralosa (FC 20% 4%) se detalla en la **Tabla 7**. La razón de llevar a cabo la identificación en la FC de dicha formulación de galleta se basó en su destacada capacidad antioxidante medida por los ensayos ABTS y ORAC-FL como se muestra posteriormente en la **Figura 16**.

Como se logra observar, en la FC de la galleta 20% 4%, las áreas de los compuestos fenólicos predominantes fueron el trímero de procianidina (Rt 9,10 min), seguido de la malvidina-3-O-(6'-p-coumaroil)glucósido.

En la FC del orujo, los compuestos con las áreas predominantes fueron la malvidina-3-O-glucósido (1984,71 µg/ g FC orujo), la malvidina-3-O-(6'-p-coumaroyl)glucósido, el trímero de procianidina (Rt 9,0 min) y la (+)-catequina en orden descendente.

Respecto a la comparación entre ambas FC, todos los compuestos fenólicos identificados en la FC del TGP fueron también identificados en la FC de la galleta a excepción del ácido trans-caftárico, la (-)-epicatequina galato, la mirecetina-3-O-glucósido, la cianidina-3-O-glucósido y la peonidina-3-O-(6'-acetil)glucósido que fueron solo identificados en la FC del TGP. Esto concuerda con los resultados de la **Tabla 6**, donde estos compuestos ya no se encontraban en la galleta sin digerir, pudiendo deberse a la degradación durante el horneado o a su interacción con los macro componentes de los ingredientes de la galleta. A su vez, como era de esperar (ya que la galleta solo contiene un 20% de TGP) todos los compuestos fenólicos identificados en la FC del TGP presentaron una mayor área que en la FC de galleta, con la excepción del trímero de procianidina (Rt 9,10 min), que se encontró en mayor medida en la FC de la galleta respecto a la FC del TGP.

Tabla 7. Datos sobre la identificación de compuestos fenólicos presentes en la Fracción Colónica del orujo de uva Tannat (FC TGP) y en la Fracción Colónica de la galleta con 20% de TGP y 4% de sucralosa (FC 20% 4%). En la FC de la galleta control con 4% de sucralosa no se identificaron compuestos fenólicos (datos no mostrados).

Compuesto	FC TGP		FC Galleta 20% 4%		FC TGP	FC Galleta 20% 4%		
	Rt (min)	Área	Rt (min)	Área	µg/g FC TGP*	µg/g FC galleta*		
Cromatograma 280 nm	Ácidos fenólicos	Ácido cis-caftarico						
		Ácido trans-caftarico	6,911	16981		82,97		
		Ácido protocatecuico						
		Ácido trans-coutárico						
		p-coumaroil hexosa						
	Flavan-3-oles	Trimerio de procianidina C2	4,62	4624	4,867	1495	22,59	7,26
		Dimero de procianidina B1	7,334	9819	7,224	2166	47,98	10,52
		Dimero de procianidina B3	7,795	63891	7,768	21267	312,18	103,29
		(+)-Catequina	8,335	130356	8,274	41044	636,93	199,35
		Trimerio de procianidina	9,008	185897	9,109	271845	908,31	1320,32
		Trimerio de procianidina	10,554	99312	10,509	30335	485,25	147,33
		Dimero de procianidina B4	11,397	35471	11,299	9612	173,31	46,68
		Dimero de procianidina B6	11,952	22016	11,826	3210	107,57	15,59
		(-)-Epicatequina	12,442	84897	12,379	28992	412,86	140,81
		Dimero de procianidina galoilado	15,364	19076	15,346	14467	93,21	70,26
		Trimerio de procianidina						
		Trimerio de procianidina						
		Dimero de procianidina B2						
		Dimero de procianidina galoilado						
Dimero de procianidina B7								
(-)-Epicatequina galato	18,389	6723			32,85			
Flavonoles	Miricetina-3-O-galactósido					44,01		
	Miricetina-3-O-glucósido	21,816	9007					
	Quercetina-3-O-galactósido							
	Quercetina-3-O-glucósido	23,388	60556	23,385	4589	295,88	22,29	
	Siringetina-3-O-glucósido							
	Quercetina-7-O-neohesperidosido	28,161	26998	28,204	8073	131,91	39,21	
Quercetina (aglicona)	35,086	44860	35,165	15043	219,19	73,06		
Cromatograma 520	Antocianinas	Delfinidina-3-O-glucósido	14,221	6325	14,236	1490	30,90	7,24
		Cianidina-3-O-glucósido	16,208	2038			9,96	
		Petunidina-3-O-glucósido	17,65	54033	17,709	6960	264,01	33,80
		Peonidina-3-O-glucósido	19,669	36138	19,771	1733	176,57	8,42
		Malvidina-3-O-glucósido	20,771	398827	20,925	42507	1984,71	206,45
		Petunidina-3-O-(6'-acetil)glucósido	26,555	10056	26,61	1621	49,13	7,87
		Peonidina-3-O-(6'-acetil)glucósido	28,907	6793			33,19	
		Malvidina-3-O-(6'-acetil)glucósido	29,508	39730	29,555	4603	194,12	22,36

Delfinidina-3-O-(6'-p-coumaroil)glucósido	30,471	26936	30,527	9299	131,61	45,16
Malvidina-3-O-(6'-cafeoil)glucósido	32,356	30092	32,39	3240	147,03	15,74
Cianidina-3-O-(6'-p-coumaroil)glucósido	32,766	8846	32,812	2113	43,22	10,26
Petunidina-3-O-(6'-p-coumaroil)glucósido	33,448	55245	33,495	17043	269,93	82,78
Peonidina-3-O-(6'-p-coumaroil)glucósido	35,865	37621	35,913	10862	183,82	52,76
Malvidina-3-O-(6'-p-coumaroil)glucósido	36,19	362321	36,236	121228	1770,34	588,79
Σ					9.295,54	3.277,6

*Determinado en base a una curva de calibración de Malvidina-3-O-glucósido.

Al comparar los perfiles de compuestos fenólicos antes (**Tabla 6**) y después (**Tabla 7**) de la simulación de la digestión gastrointestinal de la galleta, se observa un aumento en el área de ciertos compuestos en la FC de la galleta en comparación con la galleta sin digerir. Específicamente, se evidenció un incremento del 56% en el área total de la FC de la galleta con respecto a la galleta sin digerir, indicando que 14 de los 25 compuestos fenólicos identificados aumentaron su área en la FC en comparación con la galleta no digerida. El aumento del área de los compuestos en la FC podría atribuirse, en parte, a su liberación parcial durante la digestión *in vitro*, debido a la ruptura de las interacciones con las macromoléculas, incluyendo proteínas, lípidos y otros componentes, presentes en los ingredientes de la galleta. Esta interacción podría dificultar su liberación completa durante el proceso de extracción, y en consecuencia no ser determinados enteramente en la galleta previo a la digestión (González-Aguilar et al., 2017). Sin embargo, durante la digestión, se producen alteraciones en dichas interacciones debido a la acción de las enzimas digestivas y las condiciones ácidas del estómago y los compuestos fenólicos pueden experimentar liberación (Núñez-Gómez et al., 2023). Esto ocasionaría una liberación parcial de los compuestos en la FC que posteriormente, en el proceso de extracción con solventes, es probable que se liberen completamente (González-Aguilar et al., 2017; Nieto et al., 2023) manifestándose en un incremento del área total en la FC luego de la digestión en comparación con la galleta sin digerir. Específicamente, el compuesto que experimentó el mayor aumento en la FC de la galleta con TGP en comparación con la galleta sin digerir fue uno de los trímeros de procianidina (Rt 9,10 min). La presencia predominante del trímero de procianidina (Rt 9,10 min), puede atribuirse, en parte, a su alta estabilidad durante los procesos de digestión gástrica y duodenal, como se ha reportado previamente (Unusan, 2020). Esta alta estabilidad puede

hacer que sea menos susceptibles a la descomposición durante la digestión lo que puede contribuir al alto contenido de procianidina observado en la FC de la galleta.

A su vez, se ha reportado acerca de las interacciones significativas entre procianidinas poliméricas y enzimas digestivas, sugiriendo la precipitación potencial del trímero de procianidina con enzimas digestivas durante el proceso de simulación de la digestión (Nieto et al., 2023), lo que significa que estos compuestos se encontrarían en la fracción insoluble, como se observa en el presente estudio. Investigaciones previas, como la de Nieto et al. (2023) han destacado los cambios significativos en los compuestos fenólicos durante el proceso de digestión. Su investigación demostró una disminución en los flavanoles, específicamente en las procianidinas poliméricas, en la fracción bioaccesible de extractos de tallos de uva después de la simulación *in vitro* de la digestión. Además, establecieron una correlación directa entre la reducción en la actividad antioxidante y la pérdida de procianidinas poliméricas durante la digestión, respaldando la importancia de comprender la dinámica de estos compuestos durante el proceso digestivo.

Además de la precipitación, la polimerización de compuestos fenólicos durante la digestión se propone como otra posible hipótesis para explicar su mayor contenido. Wojtunik-Kulesza et al. (2020) han informado que los cambios de pH durante el proceso de digestión pueden influir en el grado de polimerización de los compuestos fenólicos. La polimerización de compuestos fenólicos ya ha sido reportada durante el proceso de envejecimiento del vino (He et al., 2012). Esta presencia predominante de trímeros de procianidina (Rt 9,10 min) obtenida en el presente trabajo podría ser beneficiosa para la salud del consumidor. Una vez en el colon, las procianidinas y sus unidades monoméricas podrían ser metabolizadas por la microbiota, cambiando su biodisponibilidad al dar lugar a la formación de varios ácidos fenólicos de bajo peso molecular con posibles efectos para la salud (Chedea et al., 2018; Unusan, 2020).

Respecto a la comparación de los perfiles de compuestos antes (**Tabla 6**) y después (**Tabla 7**) de la simulación de la digestión gastrointestinal del TGP, se observa un mayor porcentaje de pérdida de compuestos luego de la digestión en comparación con la pérdida experimentada en la FC de la galleta. Es decir, en proporción, la FC de TGP presentó una

mayor pérdida de compuestos fenólicos que la FC de la galleta con TGP. Se observa que los compuestos que no se encontraron en la FC del TGP pero sí en el TGP, fueron prácticamente los mismos que no se identificaron en la galleta sin digerir: ácido cis-caftárico, ácido protocatecuico, ácido trans-caftárico, p-cumaroil hexosa, trímero de procianidina (Rt 16,02), trímero de procianidina (Rt 16,32), dímero de procianidina B2, dímero de procianidina galoilado, dímero de procianidina B7, miricetina-3-O-galactósido, quercetina-3-O-galactósido y siringetina-3-O-glucósido. Esto puede significar que la baja estabilidad de dichos compuestos ya sea por la elevada temperatura (Martini et al., 2021; Ou et al., 2019) a la que son sometidos durante el procesamiento del alimento o a las condiciones de la simulación de la digestión gastrointestinal donde las enzimas digestivas, los cambios de pH y otros factores pueden favorecer la degradación, metabolismo y/o transformación en otros productos de ciertos compuestos fenólicos (Cavia et al., 2023; Luo et al., 2022). Otro de los aspectos a destacar es que la (-)-epicatequina galato, la delfinidina-3-O-glucósido y la cianidina-3-O-glucósido no se encontraron en el TGP previo a la digestión, pero sí en su FC. Este hecho podría indicar una liberación de estos compuestos de la matriz alimentaria durante el proceso digestivo, lo que llevó a su identificación en la FC (González-Aguilar et al., 2017; Nieto et al., 2023).

Hasta donde llega nuestro conocimiento, este es el primer estudio que identifica compuestos en el residuo no digerible de una galleta con un subproducto de la industria vitivinícola.

5.2.2. Contenido de polifenoles totales en las Fracciones Bioaccesibles (FB) y Fracciones Colónicas (FC)

Los compuestos fenólicos presentes en el orujo de uva Tannat (TGP) no mostraron ser bioaccesibles al ser incorporados a una matriz alimentaria como la de la galleta (**Figura 15**), ya que el contenido de polifenoles totales (TPC) mostró ser el mismo para las Fracciones Bioaccesibles (FB) de las galletas con y sin la adición de TGP. Por el contrario, el TPC de las Fracciones Colónicas (FC) de las diferentes formulaciones obtenidas en la simulación gastrointestinal sí mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) presentando las formulaciones con 20 y 15 % de TGP los valores más altos. La existencia de

compuestos fenólicos no bioaccesibles, que no son absorbidos en el intestino delgado y llegan al colon junto con polisacáridos no digeribles, ha sido reportada anteriormente. En el colon, estos compuestos pueden interactuar con la microbiota intestinal y generar metabolitos con relevancia fisiológica (Makarewicz et al., 2021; Taladrid et al., 2021). Si bien hasta dónde llega nuestro conocimiento, no hay información sobre los compuestos fenólicos totales en la fracción colónica del orujo de uva, esta tendencia ha sido observada previamente en otro subproducto de la industria agroalimentaria, como es la cáscara de palta. Se ha demostrado que la mayoría de los compuestos fenólicos (aproximadamente el 66%), incluidos taninos condensables e hidrolizables, resisten la digestión gastrointestinal y se mantienen en la fracción no digestible, lo que les confiere la posibilidad de llegar al colon y ser metabolizados allí (Salazar-López et al., 2021).

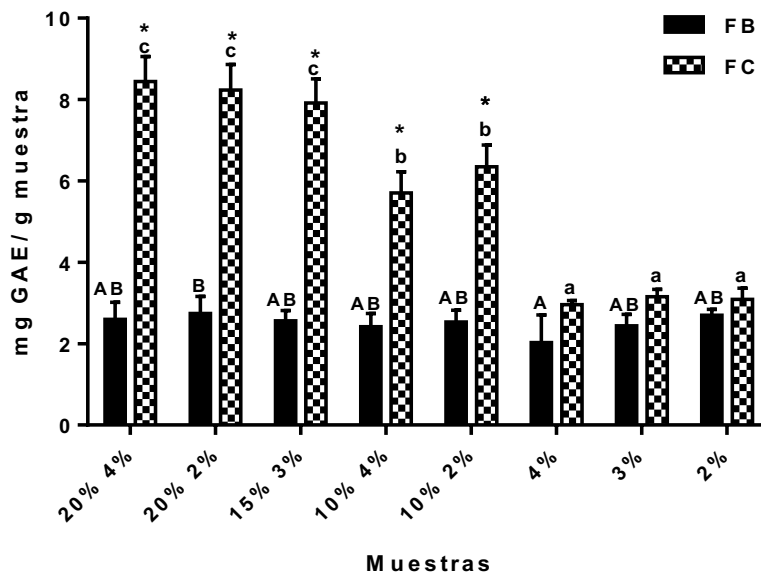


Figura 15. Contenido de Polifenoles Totales (TPC) en las Fracciones Bioaccesibles (FB) y en las Fracciones Colónicas (FC) de las diferentes formulaciones de galletas (TGP% sucralosa%). Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Letras diferentes en mayúscula denotan diferencias significativas entre las FB de las diferentes formulaciones (Tukey, $p < 0,05$). Letras diferentes en minúscula denotan diferencias significativas entre las FC de las diferentes formulaciones (Tukey, $p < 0,05$). * Indica diferencias significativas entre la FB y la FC de una misma formulación de galleta con TGP (t-test, $p < 0,05$).

Al comparar el TPC de las galletas antes (**Figura 10**) y después (**Figura 15**) de la digestión *in vitro*, se evidencian cambios. Antes de la digestión, la galleta con 20% de TGP y 4% de sucralosa (20% 4%) presentaba un TPC de $1,85 \pm 0,04$ mg GAE/g. Luego de la digestión, la FB de dicha galleta no mostró un aumento significativo ($p < 0,05$), alcanzando un valor de $2,60 \pm 0,42$ mg GAE/g. Sin embargo, la FC de la misma formulación sí exhibió un incremento ($p < 0,05$), alcanzando un TPC de $8,44 \pm 0,62$ mg GAE/g. Estos resultados indican un aumento sustancial en la concentración de compuestos fenólicos en la FC luego de la digestión respecto a la galleta sin digerir, resaltando el impacto de la digestión gastrointestinal en la liberación parcial de los compuestos fenólicos de la matriz alimentaria. Esto a su vez se confirma en la identificación de compuestos fenólicos donde el área total de los compuestos identificados por HPLC-DAD-MS en la FC (**Tabla 7**) aumenta más del doble en comparación con el área total de los compuestos en la galleta sin digerir (**Tabla 6**), respaldando la idea de que la digestión contribuye a la liberación parcial y concentración de estos compuestos, potencialmente relevantes para la salud.

5.2.3. Análisis de propiedades bioactivas en las Fracciones Bioaccesibles (FB) y Fracciones Colónicas (FC)

El análisis de las propiedades bioactivas *in vitro* consistió en la determinación en las FB y FC de la capacidad antioxidante por los métodos de ABTS y ORAC-FL, la capacidad antidiabética por la inhibición de la α -glucosidasa y la capacidad antiobesidad por la inhibición de la lipasa pancreática.

5.2.3.1. Capacidad antioxidante por ABTS y ORAC-FL

Los compuestos fenólicos son reconocidos como antioxidantes destacados debido a su capacidad de neutralizar radicales libres mediante diversos mecanismos de acción dentro de los que se incluye la Transferencia del Átomo de Hidrógeno (HAT) y la Transferencia de Electrones (ET) (Pisoschi & Pop, 2015; Wojtunik-Kulesza et al., 2020). Los compuestos fenólicos pueden ser transformados en el tracto digestivo (Luo et al., 2022), por lo que resulta importante determinar el mecanismo de acción de los compuestos antioxidantes que puedan ejercer una vez que transitan por el tracto gastrointestinal. Respecto a los compuestos antioxidantes presentes en la FC de las galletas con TGP, los mismos

exhibieron tanto mecanismo de acción ET (**Figura 16a**) como HAT (**Figura 16b**). Cabe destacar que la capacidad antioxidante en la FC siguió la misma tendencia que los resultados de TPC, donde las formulaciones de galletas con un mayor porcentaje de TGP (20 y 15% de TGP) presentaron la mayor capacidad antioxidante (**Figura 16a**). Por otro lado, los compuestos en la Fracción Bioaccesible (FB) de las galletas con TGP mostraron predominantemente mecanismo de acción HAT (**Figura 16b**), alcanzando los mismos valores que la FC. Igualmente, la capacidad antioxidante detectada mediante ambos mecanismos de acción en la Fracción Bioaccesible (FB) no puede atribuirse exclusivamente a la presencia de compuestos fenólicos derivados del TGP ya que, al comparar la capacidad antioxidante de las FB de las galletas con y sin TGP (galletas control), se observa una capacidad antioxidante similar ($p>0,05$). Este resultado sugiere la existencia de otros factores o interacciones que podrían influir en la capacidad antioxidante con acción HAT observada en las FB. Por lo tanto, se resalta la importancia del uso de varios métodos para determinar el potencial antioxidante ya que cada método puede proporcionar información complementaria sobre la actividad antioxidante de los compuestos y su mecanismo de acción (Kotha et al., 2022).

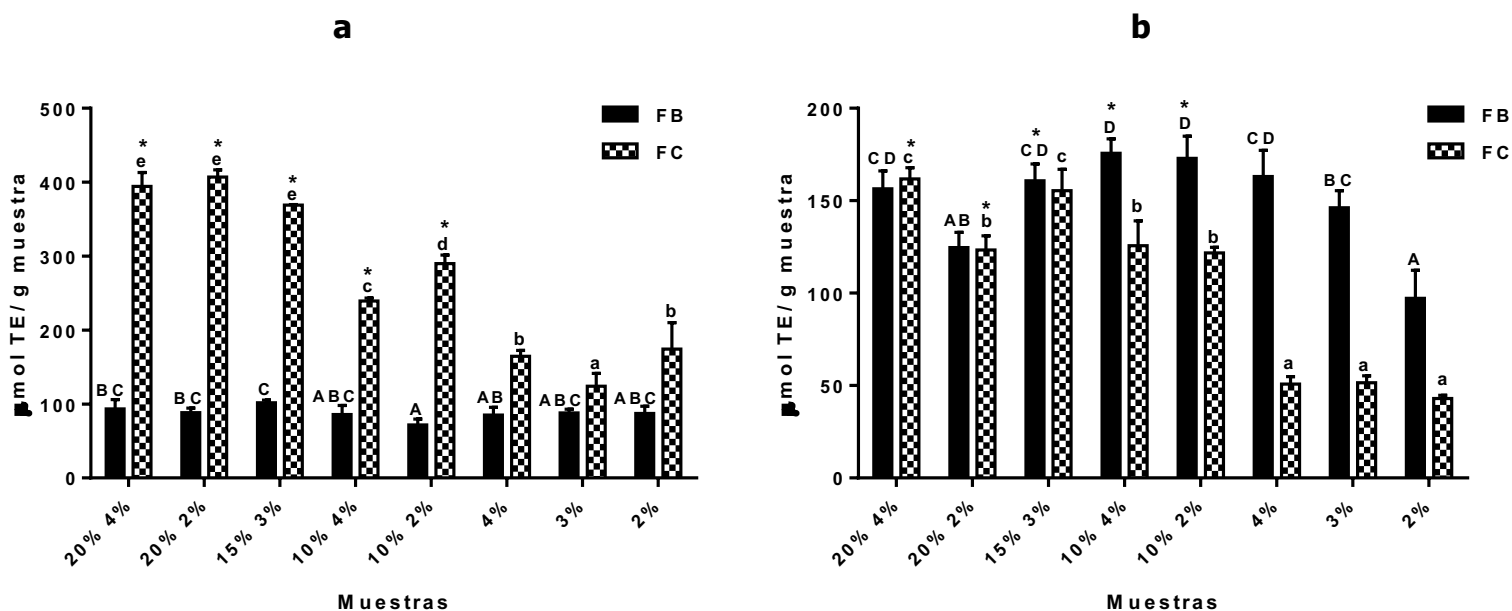


Figura 16. Capacidad antioxidante medida por ABTS (a) y ORAC-FL (b) en las Fracciones Bioaccesibles (FB) y en las Fracciones colónicas (FC) de las diferentes formulaciones de galletas

(TGP% sucralosa%). Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Letras diferentes en mayúscula denotan diferencias significativas entre las FB de las diferentes formulaciones (Tukey, $p < 0,05$). Letras diferentes en minúscula denotan diferencias significativas entre las FC de las diferentes formulaciones (Tukey, $p < 0,05$). * Indica diferencias significativas entre la FB y la FC de una misma formulación de galleta con TGP (t-test, $p < 0,05$).

Durante el proceso de digestión, las proteínas experimentan hidrólisis tanto en el estómago, gracias a la acción de la pepsina, como en el intestino delgado, donde intervienen las proteasas (Oliviero et al., 2023). Este proceso libera aminoácidos y péptidos bioactivos a partir de la estructura proteica original de los componentes de la matriz alimentaria. Los péptidos bioactivos se definen como secuencias de péptidos dentro de una proteína que, al ser liberadas, generan efectos beneficiosos en las funciones del cuerpo y contribuyen positivamente a la salud humana (Chakrabarti et al., 2018; Oliviero et al., 2023). Varios estudios han corroborado que determinados péptidos bioactivos exhiben propiedades antioxidantes, antidiabéticas, antihipertensivas, antiinflamatorias, entre otras (Moreno-Fernández et al., 2020). Se ha verificado específicamente que durante el proceso de digestión se liberan péptidos bioactivos a partir de las proteínas presentes en la harina de trigo y del huevo (Oliviero et al., 2023).

Nuestros resultados indican que luego del proceso de digestión *in vitro*, los compuestos con capacidad antioxidante presentes en las FB podrían consistir de péptidos bioactivos. Estos péptidos bioactivos pueden haberse originando a partir de las proteínas presentes en la harina y el huevo utilizados para elaborar las galletas (Oliviero et al., 2023). A su vez, podrían ser los ácidos fenólicos presentes en la harina de trigo que hayan sido liberados durante la digestión (Fernández-Fernández et al., 2022). En contraste, los resultados de ABTS (**Figura 16a**), muestran que en todas las formulaciones las FC presentaron un mayor aumento que las FB, destacando que los compuestos antioxidantes con mecanismo de acción antioxidante ET liberados durante la digestión, persisten principalmente en la FC que se dirige posteriormente hacia el colon.

Si bien hasta dónde llega nuestro conocimiento no hay información acerca de la capacidad antioxidante de la FB y la FC luego del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* de

productos con orujo de uva, existen datos en relación con la cáscara de orujo de uva Tannat y otras fuentes polifenólicas. En contraste con los resultados hallados en el presente trabajo, en un estudio reportado por Odriozola-Serrano et al. (2023), luego de la digestión gastrointestinal *in vitro* de un extracto de rosa mosqueta, la FC presentó menor capacidad antioxidante (medida por DPPH y FRAP, siendo éstos otros métodos para determinar capacidad antioxidante) en comparación con su FB. Por el contrario, luego de la digestión química-enzimática de la cáscara de palta, en su FB no se observó capacidad antioxidante medida mediante DPPH, ABTS y FRAP. Sin embargo, se observó capacidad antioxidante en la fracción no digerible, lo que sugiere que en el proceso de digestión gastrointestinal los compuestos fenólicos llegan al colon (Salazar-López et al., 2021). Teniendo en cuenta estos reportes de otra fuente vegetal, es importante resaltar el rol que cumple la matriz en el proceso de liberación de compuestos fenólicos durante la digestión, siendo necesarios los estudios de bioaccesibilidad para cada caso.

Al comparar la capacidad antioxidante de las galletas antes (**Figura 11**) y después (**Figura 16**) de la digestión *in vitro*, se evidencia que tanto la FB como la FC exhiben una capacidad antioxidante superior en comparación con su respectiva galleta no digerida ($p < 0,05$). Como se logra observar en la **Tabla 8**, la capacidad antioxidante medida por ABTS y ORAC-FL de la FC de la formulación de galleta 20% 4% mostró un aumento del 681% y 218% respectivamente en comparación con la galleta no digerida. Por otro lado, la FB de dicha galleta mostró un incremento del 85% y 207% por ABTS y ORAC-FL respectivamente, en comparación con la galleta no digerida. Si bien, hasta donde tenemos conocimiento, no hay informes que comparen la capacidad antioxidante de productos alimenticios respecto a su FC, sí existen comparaciones respecto a su FB. La capacidad antioxidante medida por ABTS, de la FB de una galleta fortificada con extracto de cáscara de castaña (Pinto et al., 2023) y la FB de la cáscara de manzana liofilizada (Hafza Fasiha et al., 2023), siendo ambas fuentes de compuestos fenólicos como es el TGP, resultó ser inferior a la de los productos sin digerir. Estos resultados contrastan con nuestros hallazgos. En cuanto a la capacidad antioxidante medida por ABTS y ORAC-FL de la FB de galletas y yogur elaborados con cáscara de orujo de uva Tannat, mostraron

ser mayores que el producto sin digerir, en línea con nuestros resultados (Fernández-Fernández et al., 2022). Nuevamente, se resalta la importancia del rol de la matriz alimentaria al influir en la liberación de compuestos beneficiosos para la salud durante la digestión.

Tabla 8. Porcentaje de cambio en la capacidad antioxidante (CA) de la Fracción Bioaccesible (FB) o Fracción Colónica (FC) en relación con la capacidad inicial de las galletas antes de la digestión.

Formulación de galleta (TGP%/sucralosa%)	CA FB (%)	CA FC (%)	CA FB (%)	CA FC (%)
	ABTS		ORAC-FL	
20% 4%	85	681	207	218
20% 2%	102	829	236	232
15% 3%	219	1058	382	366
10% 4%	221	797	576	384
10% 2%	140	870	490	315
4%	489	1040	1940	536
3%	667	982	2015	646
2%	620	1338	2138	890

5.2.3.2. Capacidad antidiabética y antiobesidad

El análisis de la capacidad antidiabética y antiobesidad de las fracciones de galletas tras la simulación gastrointestinal tiene como objetivo comprender las interacciones entre los compuestos presentes en estas fracciones y las enzimas clave del tracto gastrointestinal, como la α -glucosidasa y la lipasa pancreática. La **Figura 17** muestra la inhibición de la α -glucosidasa (a) y la lipasa pancreática (b) por las FB y las FC de las diferentes formulaciones de galletas.

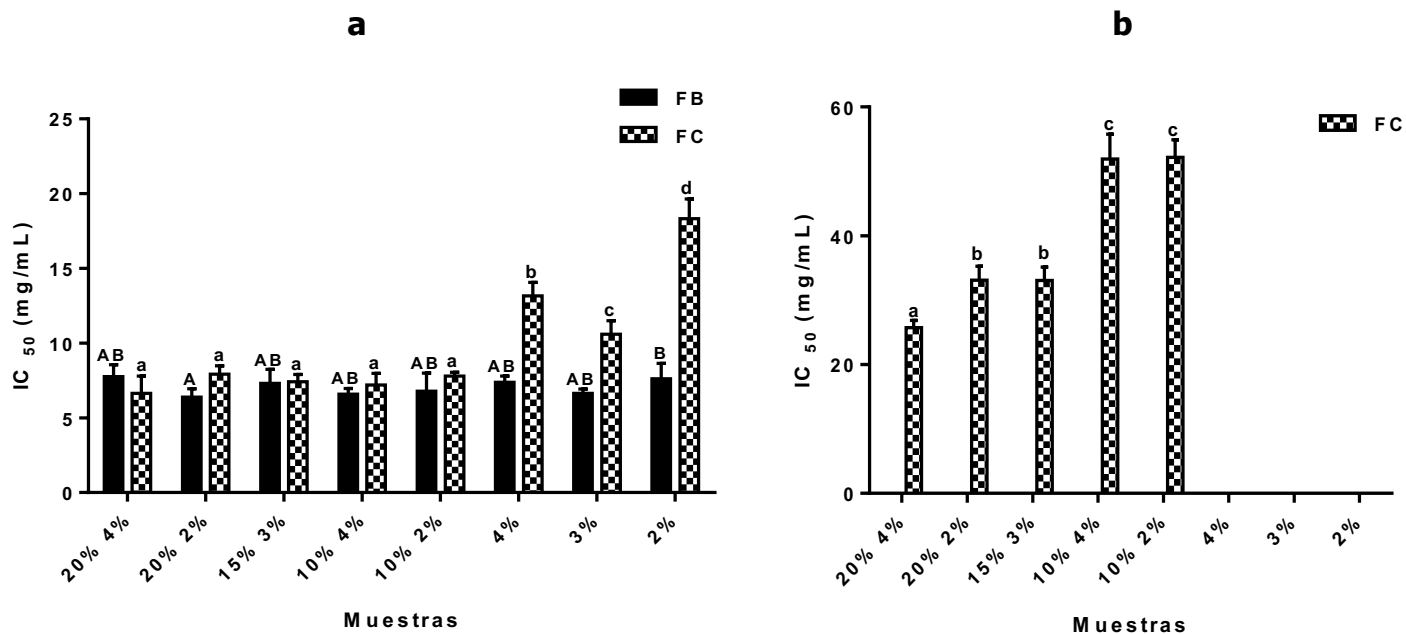


Figura 17. Actividad inhibidora de la α -glucosidasa (a) y la lipasa pancreática (b) de las Fracciones Bioaccesibles (FB) y en las Fracciones colónicas (FC) de las diferentes formulaciones de galletas (TGP% sucralosa%). Las barras de error indican la desviación estándar de la media. La lipasa pancreática no mostró ser inhibida ni por las FB ni por las FC de las galletas control (datos no mostrados). Letras diferentes en mayúscula denotan diferencias significativas entre las FB de las diferentes formulaciones (Tukey, $p < 0,05$). Letras diferentes en minúscula denotan diferencias significativas entre las FC de las diferentes formulaciones (Tukey, $p < 0,05$).

Respecto a la inhibición de la α -glucosidasa, se observa que las FB de todas las formulaciones, incluyendo las FB de las galletas controles (4%, 3% y 2%), exhibieron la misma capacidad para inhibir dicha enzima (**Figura 17a**). En línea con la tendencia observada en la capacidad antioxidante, se observa que esta capacidad inhibitoria no puede atribuirse exclusivamente a la presencia de polifenoles proporcionados por el TGP, sino más bien a compuestos presentes en la galleta (propios de los ingredientes de la formulación) que se liberan durante la digestión. Ya se ha reportado que ciertos péptidos derivados de la proteína del huevo, pueden aportar propiedades antidiabéticas. Específicamente, se ha observado que péptidos obtenidos a partir de un hidrolizado de clara de huevo exhiben actividad inhibitoria contra la α -glucosidasa (Liu et al., 2018).

A diferencia de las FB, las FC revelaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la inhibición de la α -glucosidasa entre las formulaciones con TGP y sus respectivas formulaciones control. En este caso, las galletas con TGP mostraron mayores valores de inhibición respecto a sus formulaciones controles (menor IC_{50}), lo que sugiere que la mayor actividad inhibitoria enzimática puede atribuirse a la presencia de compuestos fenólicos. Otro aspecto que sugiere que los compuestos fenólicos podrían estar contribuyendo a la mayor actividad inhibitoria es que el TPC de la FC de la galleta 20% 4% ($8,44 \pm 0,62$ mg GAE/g FC) aumentó en contraste con la galleta sin digerir ($1,85 \pm 0,04$ mg GAE/g galleta) y se relaciona con el aumento de la inhibición de la α -glucosidasa por parte de la FC de dicha galleta (IC_{50} de $6,65 \pm 1,15$ mg/mL) respecto a la galleta sin digerir (IC_{50} de $35,57 \pm 0,50$ mg/mL). Esto podría deberse a que, inicialmente en la galleta los compuestos fenólicos se encuentran interactuando con los macro componentes de los ingredientes, no encontrándose accesibles para interactuar con la enzima α -glucosidasa (Olt et al., 2023), a diferencia de la FC en donde dichas interacciones podrían haberse roto durante la digestión. La liberación parcial y concentración en la FC de dichos compuestos permitiría su interacción con la enzima y por ende su inhibición.

Como ya se mencionó anteriormente, la actividad inhibitoria de los polifenoles contra la α -glucosidasa está relacionada con su estructura química, lo que les permite interactuar con la enzima o el sustrato, disminuyendo posteriormente su actividad enzimática (Aleixandre et al., 2022). Al relacionar los compuestos fenólicos identificados en la FC de la galleta 20% 4% (**Tabla 7**) se observa que el compuesto mayoritario es el trímero de procianidina (Rt 9,10 min). Los extractos naturales, especialmente aquellos ricos en proantocianidinas, han demostrado la capacidad de inhibir las enzimas como la α -amilasa y la α -glucosidasa intestinales (Cisneros-Yupanqui et al., 2023). Se ha encontrado que las procianidinas provenientes de las semillas de uva presentan actividad anti-hiperglucémica por su capacidad para inhibir dichas enzimas. Las procianidinas, con más sitios de interacción potenciales que los compuestos fenólicos monoméricos, pueden unirse fácilmente a diferentes moléculas, incluidas las enzimas (Cisneros-Yupanqui et al., 2023).

En este contexto, la presencia de trímeros de procianidina (Rt 9,10 min) en la FC (**Tabla 7**) podría ser el factor responsable de la inhibición enzimática observada.

En cuanto a la inhibición de la lipasa pancreática (**Figura 17b**), las FB de todas las formulaciones (con y sin TGP), así como la FC de las formulaciones controles, no mostraron capacidad para inhibir dicha enzima (datos no mostrados). Por otro lado, las FC con un mayor contenido de TGP (20% y 15%) mostraron una mayor capacidad para inhibir la lipasa pancreática (menor IC_{50}), sugiriendo que la presencia de compuestos fenólicos en la FC podría estar relacionada con esta actividad inhibitoria. Se ha informado que algunos polifenoles tienen la capacidad de incidir en el tratamiento de la obesidad al inhibir enzimas relacionadas con la absorción/metabolismo de las grasas, como la lipasa pancreática. Además, se ha informado que la hesperidina extraída de los residuos de uva, las proantocianidinas del extracto de la cáscara de la uva y las catequinas del té tienen la capacidad de inhibir la lipasa pancreática (Dwibedi et al., 2022), pudiendo ser los responsables de la capacidad inhibitoria mostrada por la FC.

5.2.4. Ensayos celulares

A las FB y a las FC se les se realizaron determinaciones de la capacidad antioxidante y antiinflamatoria en células intestinales y células del sistema inmune, respectivamente. A su vez, dentro de los ensayos celulares, se incluye el ensayo de captación de compuestos en células intestinales.

5.2.4.1. Viabilidad celular

Previo a la determinación de la capacidad antioxidante mediante la inhibición de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células de adenocarcinoma colorrectal epitelial humano (Caco-2), así como la determinación de la capacidad antiinflamatoria mediante la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos RAW 264.7, se realizó la prueba de viabilidad celular mediante MTT con el objetivo de evaluar las concentraciones no letales para utilizar posteriormente en dichos ensayos. Los resultados de la viabilidad celular de ambas líneas celulares se muestran en la **Figura 18**.

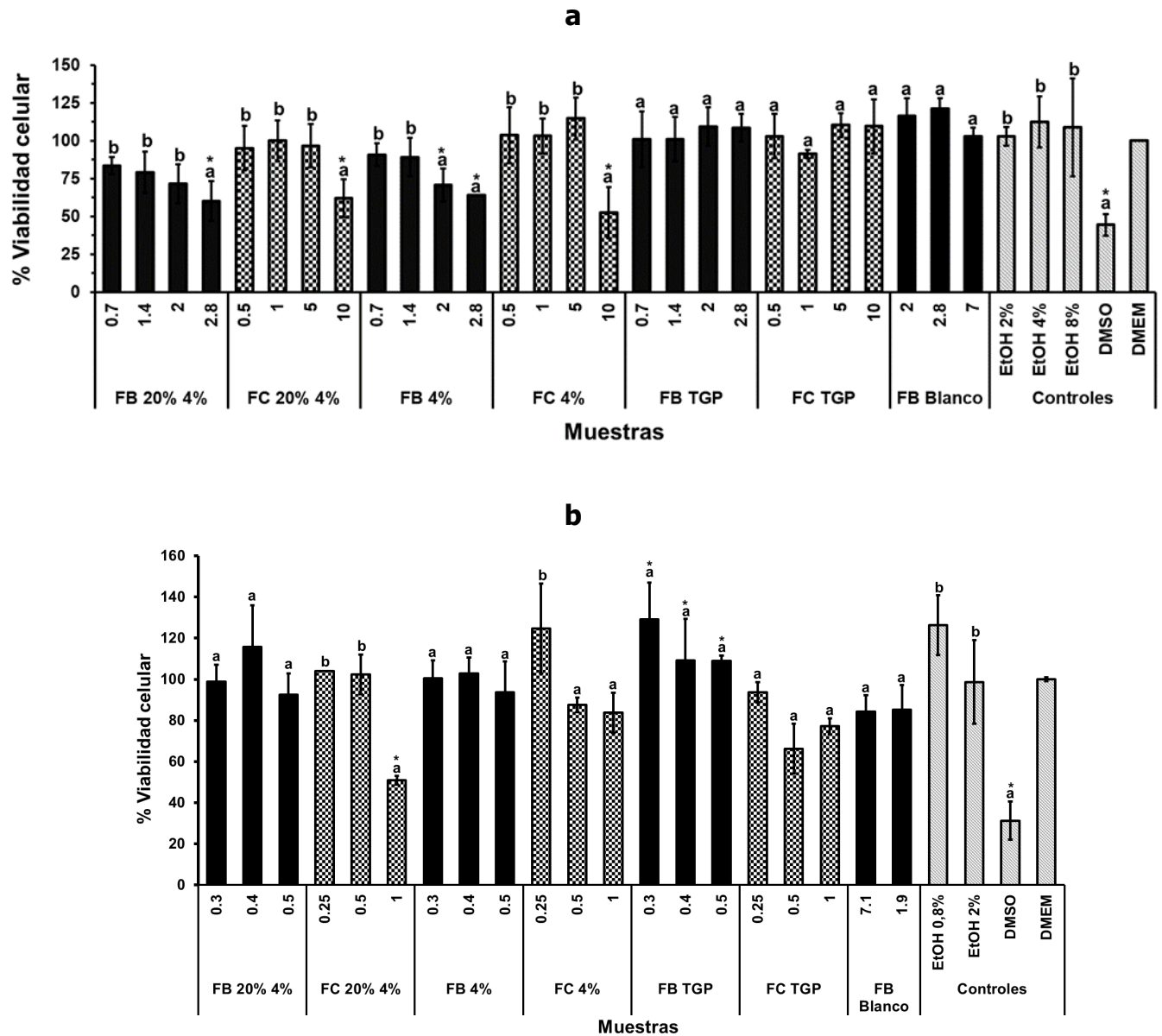


Figura 18. Viabilidad celular de las células Caco-2 (a) y de los macrófagos RAW 264.7 (b) tratadas con diferentes concentraciones de la Fracción Bioaccesible (FB) y Fracción Colónica (FC) de la formulación de galleta 20% 4%, la galleta control 4% y del orujo (TGP). El control positivo consistió en DMEM representando el 100% de viabilidad, mientras que el control negativo consistió en DMSO:DMEM (50:50). Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre las diluciones de la misma muestra (Tukey, $p < 0,05$). * Indica diferencias significativas entre la muestra y el control positivo (DMEM) (t-test, $p < 0,05$).

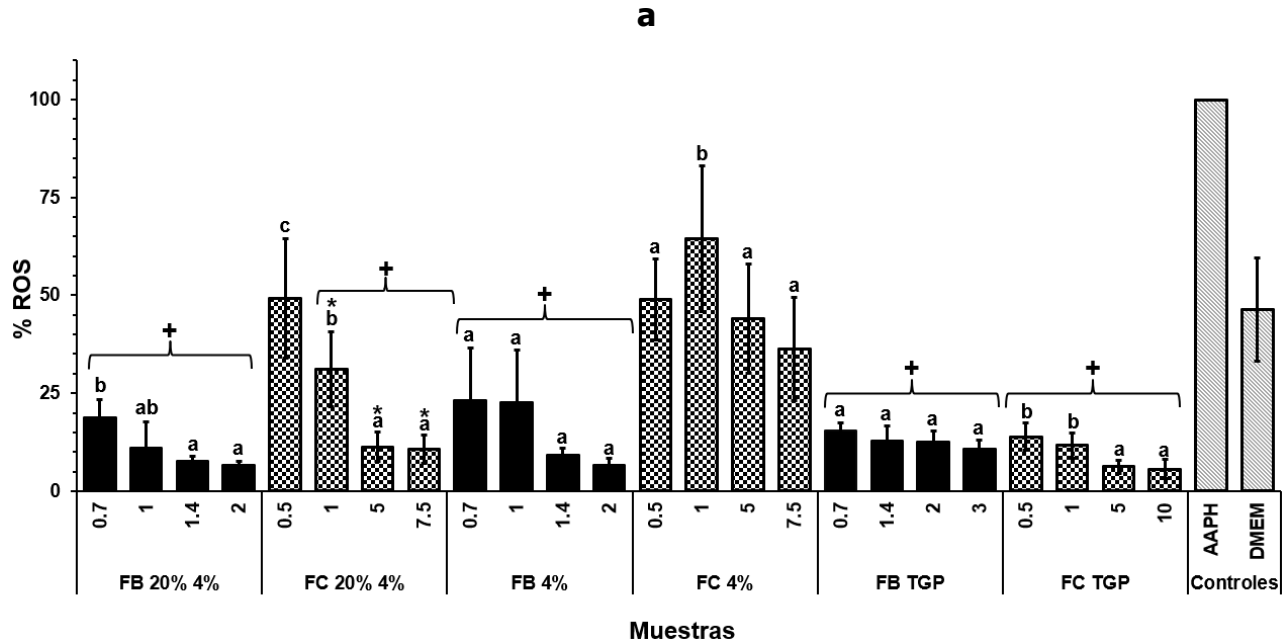
En el caso de las células Caco-2 (**Figura 18a**) se observó que la dosis más alta de las FC (10 mg/mL) y FB (2,8 mg/mL) de ambas galletas redujo su viabilidad celular por debajo del 80% luego de un tratamiento por 24 horas. Por este motivo, en el ensayo de la determinación de formación de ROS, se seleccionaron concentraciones de las FC de galletas de 0,5 a 7,5 mg/mL, y de la FB de 0,7 a 2 mg/mL ya que estas no resultaron tóxicas para las células, manteniendo la viabilidad celular alrededor del 100%. Respecto a la FB y FC del TGP, ninguna de las concentraciones utilizadas afectó la viabilidad celular. Se ha informado que concentraciones de 0,1 a 0,5 mg/mL de la FB de un extracto de cáscara de uva de orujo Tannat no fueron citotóxicas en células humanas normales de colon (CCD-18Co) (Fernández-Fernández et al., 2020). Aunque las concentraciones en el estudio mencionado fueron más bajas que las utilizadas en el presente trabajo, es importante considerar que estos datos pertenecen a un extracto donde los compuestos fenólicos están concentrados, lo que podría influir en la viabilidad celular. Además, la línea celular utilizada en ese estudio es diferente a la del presente trabajo, lo que podría implicar una sensibilidad diferente a las fracciones bioaccesibles.

En el caso de los macrófagos RAW 264.7 (**Figura 18b**), el tratamiento con la dosis más alta (1 mg/mL) de la FC de la galleta con TGP redujo la viabilidad celular por debajo del 80%, por lo que en el ensayo de producción de NO se utilizaron concentraciones inferiores a la mencionada anteriormente. A su vez, se observa que la FB del TGP aumento la viabilidad celular ($p < 0,05$) respecto al control positivo (DMEM). Esta tendencia de aumento en la viabilidad celular ya ha sido reportada para la FB de uva blanca en otra línea celular (Caco-2) según lo reportado por Lingua et al. (2019). Se destaca el potencial de los polifenoles en la FB para aumentar la viabilidad de diferentes líneas celulares.

Cabe destacar que tanto las diferentes concentraciones de EtOH (utilizado para la extracción de compuestos en las muestras FC), así como el blanco de la fracción bioaccesible (FB Blanco), el cual corresponde únicamente a los reactivos utilizados en la simulación de la digestión sin muestra, no afectaron la viabilidad celular de ambas líneas celulares.

5.2.4.2. Capacidad antioxidante por la inhibición de la formación de ROS intracelulares

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se generan de forma endógena en el organismo, y su generación excesiva puede dar lugar al estrés oxidativo, el cual puede provocar daño celular y contribuir al desarrollo de diversas enfermedades (Kotha et al., 2022). Evaluar el efecto de los alimentos sobre la formación intracelular de ROS, proporciona información sobre la interacción y los efectos beneficiosos que los compuestos bioactivos pueden tener en el entorno celular. En este contexto, se evaluó el efecto antioxidante mediante la determinación de la formación intracelular de ROS de las fracciones obtenidas luego de la simulación de la digestión gastrointestinal (FB y FC) de la galleta 20% 4%, de su galleta control 4%, así como del TGP, en células de adenocarcinoma colorrectal epitelial humano (Caco-2) bajo condiciones inducidas de oxidación por el agente oxidante AAPH (1 mM) (**Figura 19**). La elección de dicha formulación de galleta (20% 4%) se basó en su destacada capacidad antioxidante medida por los ensayos ABTS y ORAC-FL (**Figura 16**).



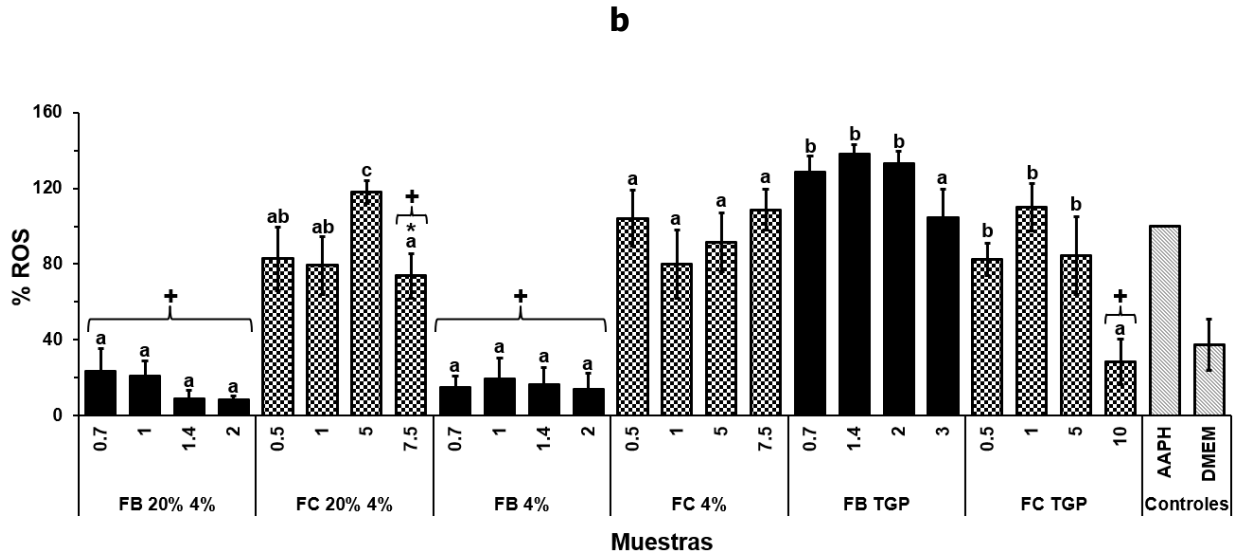


Figura 19. Medición de ROS intracelulares en células Caco-2 mediante el ensayo de Prevención con co-administración (a) y el ensayo de Prevención (b) en la Fracción Bioaccesible (FB) y Fracción Colónica (FC) de la formulación de galleta 20% 4%, la galleta control 4% y del orujo de uva Tannat (TGP). Las concentraciones de las muestras se expresan en mg/mL de muestra. El control positivo consistió en DMEM-P/S con AAPH 1mM mientras que el control negativo en DMEM-P/S. Las barras de error indican la desviación error estándar de la media. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre las diluciones de la misma muestra (Tukey, $p < 0,05$). * Indica diferencias significativas entre las mismas diluciones de la FB o la FC de la galleta con TGP y su galleta control (t-test, $p < 0,05$). + Indica diferencias significativas entre la muestra y el control positivo (AAPH) (t-test, $p < 0,05$).

Como se logra observar, tanto en el ensayo de "Prevención con co-administración" (**Figura 19a**) como en el ensayo de "Prevención" (**Figura 19b**), las FB de ambas galletas no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ellas (misma concentración de FB 20% 4% y FB 4%) en su capacidad para reducir la formación de ROS intracelulares. No obstante, en ambos ensayos, ambas FB redujeron significativamente ($p < 0,05$) la formación de ROS intracelulares en comparación con el control positivo (AAPH) y con el blanco de digestión (datos no mostrados en la gráfica) indicando que el impacto proviene de compuestos generados en la digestión de la galleta.

Respecto a las FC de las galletas, en el ensayo de "Prevención con co-administración" la FC de la formulación 20% 4% redujo significativamente ($p < 0,05$) la formación de ROS intracelulares en comparación con su FC control, así como con el control positivo (AAPH) (**Figura 19a**). Este resultado no se observó en el ensayo de "Prevención" (**Figura 19b**), donde la FC de la formulación 20% 4% y la FC de su formulación control no solo no redujeron la formación de ROS intracelulares, sino que cierta concentración de la FC 20% 4% aumentó su producción ($p < 0,05$) respecto al control positivo (AAPH) mostrando un efecto pro-oxidante.

Acerca del TGP, su FB y su FC redujeron la formación de ROS intracelulares en el ensayo de "Prevención con co-administración" (**Figura 19a**), no así en el ensayo de "Prevención" (**Figura 19b**), donde la FB promovió su formación ($p < 0,05$) respecto al control positivo (AAPH).

Como se mencionó anteriormente, los antioxidantes pueden intervenir a través de diversos mecanismos, ya sea eliminando directamente los radicales, influyendo en la expresión génica para fortalecer las defensas antioxidantes endógenas, quelando metales de transición, entre otras actividades (Dini & Grumetto, 2022). Nuestros resultados sugieren que en las FB de ambas galletas, se encuentran ciertos compuestos, por ejemplo, péptidos bioactivos, que podrían estar asociados con la promoción de la expresión de enzimas antioxidantes (Tonolo, Grinzato, et al., 2023). Estas FB fueron las únicas muestras que, en ambos tratamientos, evidenciaron una disminución en la generación de ROS intracelulares, lo que podría estar vinculado al pretratamiento celular antes de la exposición al agente oxidante. En el caso que las FB contengan péptidos bioactivos, éstos podrían interactuar con las células y desencadenar respuestas antioxidantes al influir en vías de señalización celular que regulan la expresión de enzimas antioxidantes. En este contexto, se ha observado que ciertos péptidos exhiben capacidad antioxidante al activar factores de transcripción que estimulan la expresión de genes responsables de codificar enzimas antioxidantes (Tonolo, Coletta, et al., 2023). Por otro lado, el pretratamiento con las muestras que poseen compuestos fenólicos provenientes

del TGP, al no observar efecto en la disminución de la formación de ROS intracelulares podría implicar que no aumenten la expresión de enzimas antioxidantes.

Incluso, la FB del TGP promovió la formación de ROS intracelulares (**Figura 19b**). Los polifenoles, en ciertas circunstancias pueden actuar como prooxidantes. Se ha reportado actividad prooxidante para extractos polifenólicos preparados a partir de orujos de uva Syrah y Chardonnay (Duda-Chodak & Tarko, 2023). Este efecto puede explicarse por la dosis, ya que concentraciones altas pueden generar efectos prooxidantes, mientras que dosis bajas suelen tener respuestas positivas (Caponio et al., 2023).

Sin embargo, con los resultados presentados en la **Figura 19a**, se sugiere que los compuestos fenólicos provenientes del TGP, presentan capacidad para actuar como antioxidantes directos ya que al co-administrar la FB del TGP, su FC y la FC de la galleta 20% 4% con el agente oxidante (AAPH), se evidencia una menor cantidad de ROS intracelulares en contraste con la FC de la galleta control y con respecto al control positivo (AAPH) ($p < 0,05$). Es decir, que los compuestos fenólicos, podrían desempeñar un papel importante en la neutralización del agente oxidante, antes de entrar a la célula, y, por ende, en la protección contra el estrés oxidativo. En el estudio de Fernández-Fernández et al. (2020) se observó la misma tendencia, donde la FB de un extracto hidro-alcohólico-ácido de cáscara proveniente del orujo de uva Tannat, mostró capacidad para inhibir la formación de ROS intracelulares en células humanas normales de colon (CCD-18Co) en el ensayo de "Prevención con coadministración", no así en el ensayo de "Prevención". En lo reportado por Martins et al. (2017) se sugiere que bajo la inducción de la oxidación por AAPH, los polifenoles presentes en un extracto de orujo de uva proveniente de variedades mixtas (Syrah y Seibel), podrían eliminar eficazmente los radicales peróxido en el compartimento extracelular antes de que pudieran reaccionar con la sonda en el compartimento intracelular.

Los presentes resultados respaldan la hipótesis de que los compuestos con capacidad antioxidante provenientes del TGP al ser incorporados en una galleta, persisten en la FC y presentan potencial para ejercer efectos beneficiosos en las células intestinales. Hasta donde llega nuestro conocimiento, este es el primer estudio que investiga el efecto

antioxidante de la fracción insoluble obtenida luego de una simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro* en células intestinales.

5.2.4.3. Capacidad antiinflamatoria por la inhibición de la producción de NO

En la respuesta inflamatoria, los macrófagos activados producen grandes cantidades de factores inflamatorios como el óxido nítrico (NO) para inducir daño tisular en el sitio inflamado. Cuando la inflamación, se vuelve crónica o desregulada, puede contribuir al desarrollo de diversas enfermedades, incluyendo trastornos metabólicos, cardiovasculares y neurodegenerativos. Los compuestos con propiedades antiinflamatorias podrían modular esta respuesta, ayudando a mantener un equilibrio adecuado y a prevenir el daño celular asociado con la inflamación crónica. Por lo tanto, determinar la capacidad antiinflamatoria de los compuestos proporciona información valiosa sobre su potencial para mitigar el estrés inflamatorio y su posible utilidad terapéutica en condiciones de inflamación crónica (Rudrapal et al., 2022; Sales et al., 2023). Esta capacidad podría contrarrestar las complicaciones asociadas con enfermedades con componentes inflamatorios, como la diabetes tipo 2 o ciertas enfermedades intestinales inflamatorias (Chen et al., 2018).

En relación con el efecto antiinflamatorio (**Figura 20**), se observó que la FB de ambas galletas no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ellas en lo que respecta a la reducción en la producción de NO en macrófagos. De manera similar, tampoco demostraron capacidad para disminuir la producción de NO en comparación con el control positivo (LPS) ($p > 0,05$). La FB del TGP mostró la misma tendencia, sin capacidad para reducir la formación de NO en comparación con el LPS ($p > 0,05$). En contraste, la FC de la formulación 20% 4% mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) al reducir la producción de NO en comparación con la FC de su galleta control y con el LPS. Similar al comportamiento observado en la FC de la galleta con TGP, la FC del TGP redujo significativamente ($p < 0,05$) la producción de NO en comparación con el LPS. Dicho efecto inhibitor sobre la producción de NO observado en las FC sugiere que los compuestos fenólicos presentes en el TGP pueden desempeñar un papel en la modulación de la

producción de NO, el cual se produce en grandes cantidades en los macrófagos activados debido a la respuesta inflamatoria (Sales et al., 2023).

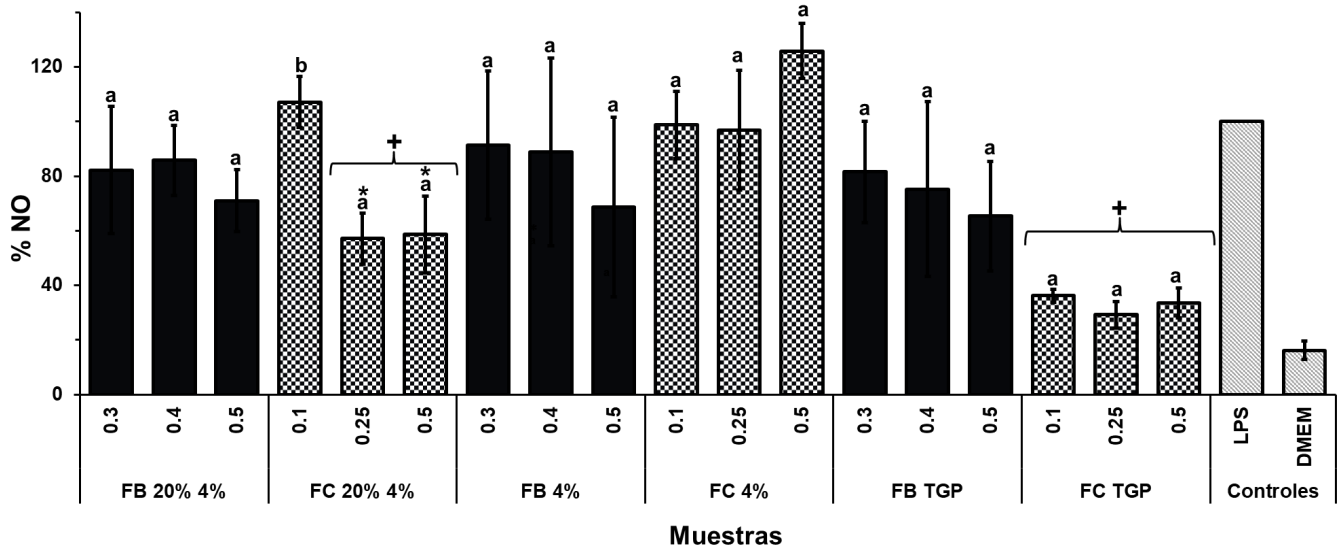


Figura 20. Evaluación de la formación de NO en macrófagos RAW 264.7 mediante el ensayo de Prevención con Co-administración en la Fracción Bioaccesible (FB) y Fracción Colónica (FC) de la formulación de galleta 20% 4%, la galleta control 4% y del orujo (TGP). Las concentraciones de las muestras se expresan en mg/mL de muestra. El control positivo consistió en DMEM con LPS 1µg/mL, mientras que el control negativo consistió en DMEM. Las barras de error indican el error estándar de la media. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre las diluciones de la misma muestra (Tukey, $p < 0,05$). * Indica diferencias significativas entre las mismas diluciones de la FB o la FC de la galleta con TGP con respecto a su galleta control (t-test, $p < 0,05$). + Indica diferencias significativas entre la muestra y el control positivo (LPS) (t-test, $p < 0,05$).

Estudios anteriores han demostrado que los compuestos fenólicos poseen propiedades antiinflamatorias y pueden disminuir la producción de NO en condiciones de inflamación (Bocsan et al., 2022). Específicamente, en línea con nuestros resultados, se ha reportado que un extracto hidro-alcohólico-ácido de la cáscara proveniente del orujo de uva Tannat disminuye la producción de NO en macrófagos RAW 264.7 bajo condiciones inducidas por LPS (Fernández-Fernández et al., 2019), así como los compuestos bioaccesibles de dicho extracto (Fernández-Fernández et al., 2020).

Como ya fue mencionado, la producción del NO es catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS). Entre las sustancias exógenas capaces de modificar la expresión o funcionalidad de las isoformas de NOS, se encuentran los polifenoles (Serreli & Deiana, 2023). La expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) se regula mediante el factor nuclear kappa B (NF-κB). En el caso de la inflamación, este factor nuclear se activa en el citosol celular y puede ser transportado al interior del núcleo, iniciando la transcripción de proteínas de señalización inflamatoria (Martins et al., 2020). Específicamente, dentro de los diversos compuestos fenólicos, la quercetina, demostró ser un compuesto capaz de activar al factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) en los macrófagos RAW 264.7, provocando la inhibición de la vía de NF-κB y, en consecuencia, la disminución de la expresión de ARN mensajero de la iNOS (Nani et al., 2021). El ácido gálico también se ha reportado como un compuesto fenólico capaz de inhibir la activación del NF-κB (Martins et al., 2020).

Del mismo modo, los compuestos fenólicos identificados en la FC de la galleta con TGP, así como en la FC del TGP como tal, (**Tabla 7**), sugieren que poseen la capacidad de modular las vías de producción del óxido nítrico en el contexto de la inflamación. En particular, el trímero de procianidina presente en la FC (Rt 9,10 min) podría ser el responsable de intervenir en dicha vía metabólica, ya que se ha reportado su capacidad para intervenir en la expresión de las diferentes isoformas de la óxido nítrico sintasas (Cui et al., 2012; Stevens et al., 2002).

5.2.4.4. Identificación de los compuestos fenólicos captados por las células intestinales

La biodisponibilidad de un compuesto en su lugar de acción implica en primer lugar su absorción por parte de la célula (Gerardi et al., 2022). La mayoría de los compuestos fenólicos presentan grados de absorción significativamente bajos en el intestino delgado (Yang et al., 2022). Esta afirmación concuerda con nuestros resultados, donde, de los 25 compuestos fenólicos identificados en la FC de la galleta con TGP (**Tabla 7**), únicamente 4 lograron ser detectados/absorbidos por las células intestinales Caco-2 (**Tabla 9**).

Tabla 9. Datos sobre la identificación de los compuestos fenólicos presentes en la Fracción Colónica del orujo de uva Tannat (FC TGP) y en la Fracción Colónica de la galleta con 20% de TGP y 4% de sucralosa (FC 20% 4%) captados por células Caco-2. En la FC de la galleta control con 4% de sucralosa no se identificaron compuestos fenólicos captados por las células (datos no mostrados).

Compuesto	FC TGP		FC Galleta 20% 4%		FC TGP	FC Galleta 20% 4%
	Rt (min)	Área	Rt (min)	Área	µg/g FC orujo*	µg/g FC galleta
(+)-Catequina	7,758	2544	7,964	1048	124,05	25,55
Trímero de procianidina	7,973	3404			165,99	
(-)-Epicatequina	12,658	2250	12,656	243	109,72	5,92
Petunidina-3-O-glucósido	17,449	1607			78,36	
Peonidina-3-O-glucósido	19,322	819			39,94	
Malvidina-3-O-glucósido	20,678	10715	20,54	677	522,50	16,51
Delfinidina-3-O-(6'-p-coumaril)glucósido	30,632	610			29,75	
Malvidina-3-O-(6'-cafeoil)glucósido	32,585	650			31,70	
Cianidina-3-O-(6'-p-coumaril)glucósido	32,914	206			10,05	
Petunidina-3-O-(6'-p-coumaril)glucósido	33,648	1567			76,41	
Peonidina-3-O-(6'-p-coumaril)glucósido	36,089	1264			61,64	
Malvidina-3-O-(6'-p-coumaril)glucósido	36,412	10706	36,39	1351	522,06	32,94
Σ					1772,16	80,92

*Determinado en base a una curva de calibración de Malvidina-3-O-glucósido.

Específicamente, los compuestos fenólicos captados por las células e identificados fueron la malvidina-3-O-(6'-p-cumaroil)glucósido, la (+)-catequina, la malvidina-3-O-glucósido (16,51 µg/g FC galleta) y la (-)-epicatequina (**Figura 21**), en orden descendente. En cuanto al TGP, de los 30 compuestos fenólicos identificados en su FC, 12 fueron identificados a nivel intracelular, siendo la malvidina-3-O-glucósido (522,50 µg/g FC TGP) la predominante, seguida de la malvidina-3-O-(6'-p-cumaroil)glucósido.

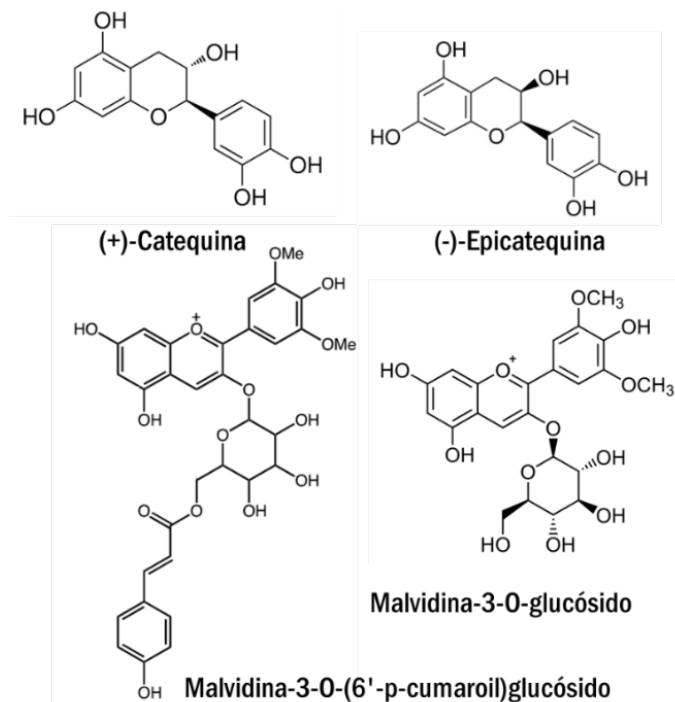


Figura 21. Estructuras químicas de la malvidina-3-O-(6'-p-cumaroil)glucósido, (+)-catequina, malvidina-3-O-glucósido y (-)-epicatequina.

Un aspecto a destacar es que, a pesar de que el trímero de procianidina fue el compuesto predominante en la FC de la galleta con TGP, e incluso se encontró en mayores cantidades en comparación con la FC del propio TGP (**Tabla 7**), solo se absorbió en el caso de la FC del TGP y no en la FC de la galleta. Esto podría deberse a interacciones del trímero de procianidina con otros componentes de la galleta presentes en su matriz alimentaria, lo que limitaría su absorción a nivel de las células intestinales. Existen estudios previos que respaldan la idea de que la absorción de polifenoles puede variar según sus interacciones específicas con componentes de los alimentos (Serra et al., 2010). A su vez, una hipótesis acerca de lo sucedido con el trímero de procianidina presente en la FC de la galleta con TGP, es que la (+)-catequina y la (-)-epicatequina absorbidos por la monocapa de células podrían derivar de dicho trímero de procianidina. El trímero de procianidina está compuesto por unidades de catequina y epicatequina, por lo que, la hipótesis sugiere que dicho compuesto pudo haber sido sometido a la acción de las enzimas del borde en cepillo de las células Caco-2, resultando en monómeros de menor tamaño facilitando así su absorción intracelular (Kosińska-Cagnazzo et al., 2015; Yang et al., 2022). Nieto et al.

(2023) demostraron que la catequina presente en diferentes extractos de tallos del orujo de uva fue el compuesto mayoritario absorbido en células Caco-2. Las catequinas y epicatequinas ingeridas por vía oral son absorbidas desde la parte superior del tracto intestinal y se han encontrado posteriormente en el plasma en forma conjugada y/o metilada (Baba et al., 2001). También se ha reportado que la epicatequina procedente del polvo de cacao es uno de los compuestos fenólicos capaces de absorberse en el intestino delgado (Baba et al., 2001).

Respecto a las antocianinas, se ha visto que su tasa de absorción gástrica (10%) supera su absorción intestinal (3-4%) (Kosinska-Cagnazzo et al., 2015). Estudios han reportado que antocianinas como la cianidina, delphinidina y malvidina-3-glucósido pueden atravesar el epitelio gástrico (Fernandes et al., 2011). No obstante, al considerar la absorción a través del epitelio intestinal, de la variedad de antocianinas presentes en la fracción bioaccesible de un extracto de frutilla, solo la pelargonidin-3-glucósido mostró ser transportada a través de una monocapa de células Caco-2 (Kosińska-Cagnazzo et al., 2015). Esto difiere de lo encontrado en nuestro estudio, donde la mayoría de los compuestos fenólicos absorbidos de la FC del TGP fueron antocianinas, como se detalla en la **Tabla 9**. El hecho de que la malvidina-3-O-glucósido y la malvidina-3-O-(6'-p-coumaroil)glucósido hayan sido las antocianinas predominantes absorbidas por las células tratadas con la FC del TGP, así como las únicas antocianinas absorbidas por las células tratadas con la FC de la galleta con TGP, no resulta sorprendente, dado que estas antocianinas fueron las predominantes en las propias FC de ambas muestras (**Tabla 7**). En un estudio sobre la absorción de compuestos fenólicos en una monocapa celular de Caco-2 tratadas con un extracto de arándanos, se observó que el glucósido de la delphinidina mostró la menor eficiencia de absorción, mientras que el glucósido de malvidina mostró la mayor eficiencia de absorción. Los investigadores sugieren que la biodisponibilidad de las antocianinas tiende a ser menor cuando hay más grupos hidroxilo libres y menos grupos OCH₃ (Yi et al., 2006).

La capacidad de estos compuestos fenólicos para ser captados por las células Caco-2 sugiere la posibilidad de que estos compuestos, si llegaran a ser liberados de la fracción

colónica en el intestino, podrían ser absorbidos a través del epitelio intestinal. Una vez que los compuestos fenólicos atraviesan el epitelio intestinal pueden ser metabolizados y los metabolitos podrían ingresar a la circulación sanguínea, para finalmente llegar a los sitios de acción y ejercer sus actividades biológicas (Gerardi et al., 2022; Núñez-Gómez et al., 2023).

Es importante destacar que aquellos compuestos fenólicos que no fueron absorbidos en el intestino delgado pueden alcanzar el colon. Luego de ser transformados por la microbiota intestinal, los metabolitos resultantes pueden ser absorbidos y transportados a través de la vena porta hasta el hígado. En este órgano, se llevan a cabo otras transformaciones, dando lugar a metabolitos de fase II. Después de una circulación extensa en el cuerpo humano, los metabolitos absorbidos se excretan a través de la orina. Por otro lado, los metabolitos no absorbidos o los sustratos no fermentados se eliminan en las heces. Este proceso refleja la complejidad del metabolismo de los compuestos fenólicos en el cuerpo y destaca la importancia de considerar las diferentes etapas de absorción, transformación y excreción en la evaluación de su impacto en la salud (Martínez-Meza et al., 2020).

5.2.5. Ensayo de fermentación colónica *in vitro*

Con el fin de evaluar el impacto de la microbiota sobre la FC de la galleta 20% 4%, de su FC control correspondiente a la galleta con 4% de sucralosa y del TGP como tal, se realizó un ensayo de fermentación colónica *in vitro*, evaluando la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) y el análisis de la población microbiana. Para ello, en primer lugar, se recibieron en el laboratorio muestras fecales de 5 niños entre 1 y 3 años, acompañadas de datos informativos (**Tabla 10**).

Tabla 10. Datos sobre los 5 donantes de la materia fecal utilizada en el ensayo de fermentación *in vitro*.

	Muestras				
	1	2	3	4	5
Edad donante (años)	3	2	1	2	3

Modo de nacimiento	Parto natural	Parto natural	Parto natural	Parto natural	Parto natural
Alimentación con fórmula	No	Sí	Sí	Sí	No
Alimentos que Consume	Todo (excepto yogur)	Todo	Todo	Todo	Todo (excepto yogur)
Lactancia	Hasta los 2 años	Hasta el primer año	Hasta el primer año	Hasta los 7 meses	Hasta los 2 años

5.2.5.1. Identificación y cuantificación de ácidos grasos de cadena corta

Como ya se mencionó anteriormente, los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) son productos de la fermentación de la microbiota de ciertos componentes que permanecen sin digerir al pasar por el tracto intestinal.

La producción de SCFAs en el intestino grueso está influenciada por diversos factores, tales como el tiempo de tránsito intestinal, la dieta del huésped y la composición de la microbiota (Zahid et al., 2023).

En este contexto la **Tabla 11** muestra las concentraciones de diferentes SCFAs (ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y ácido láctico) encontrados durante diferentes tiempos de fermentación colónica *in vitro* (24, 48 y 72 horas) por diferentes muestras (FC 20% 4%, FC 4%, FC TGP y controles).

Tabla 11. Identificación y cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y ácido láctico) a diferentes tiempos de fermentación (0, 24, 48 y 72 horas) de la Fracción Colónica (FC) de la galleta con 20 % de orujo de uva Tannat y 4% de sucralosa (FC 20% 4%), la FC de su galleta control (FC 4%), la FC del orujo de uva Tannat (FC TGP) e inulina comercial con fines comparativos (I comercial).

		[Ác acético]	[Ác propiónico]	[Ác butírico]	[Ác láctico]
		mM	mM	mM	mM
0 horas	Medio basal	1,85	5,47	0	0
	FC TGP	2,65	5,90	0	0
	FC 4%	2,73	5,99	0	0
	FC 20% 4%	2,82	6,20	0	0
Medio basal		11,85 ± 1,12 a	10,61 ± 1,39 a	0	1,98 ± 1,04 a

24 horas	Inulina	14,73 ± 1,69 a	7,96 ± 0,89 a	0	19,91 ± 1,46 c
	FC TGP	10,98 ± 2,15 a	9,04 ± 0,63 a	0	2,00 ± 0,28 a
	FC 4%	10,79 ± 0,27 a	10,64 ± 1,48 a	0	15,50 ± 2,20 b
	FC 20% 4%	14,54 ± 2,49 a	15,46 ± 3,26 b	0	2,35 ± 0,64 a
48 horas	Medio basal	14,36 ± 0,75 b	10,73 ± 0,72 b	1,37 ± 0,21	1,37 ± 0,05 a
	Inulina	20,16 ± 1,02 cd	8,38 ± 0,51 a	0	23,07 ± 0,67 d
	FC TGP	17,93 ± 0,67 c	16,32 ± 0,42 c	0	1,60 ± 0,29 b
	FC 4%	11,07 ± 0,13 a	11,41 ± 0,46 b	0	18,47 ± 0,94 c
	FC 20% 4%	21,50 ± 1,28 d	24,39 ± 1,52 d	0	0
72 horas	Medio basal	17,39 ± 0,65 bc	13,40 ± 0,73 a	1,60 ± 0,35 b	1,25 ± 0,73 a
	Inulina	20,91 ± 0,47 cd	8,66 ± 0,27 a	0 a	25,33 ± 1,35 c
	FC TGP	16,03 ± 2,15 b	14,12 ± 1,85 a	1,35 ± 0,10 b	1,09 ± 0,63 a
	FC 4%	10,45 ± 1,72 a	12,68 ± 4,56 a	0,72 ± 0,42 a	18,57 ± 0,64 b
	FC 20% 4%	23,14 ± 1,02 d	24,86 ± 1,38 b	2,02 ± 0,12 b	0

Letras diferentes denotan diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$) entre las diferentes muestras en el mismo tiempo de fermentación.

Como primer punto a destacar, se observa que en las muestras fecales iniciales (tiempo 0 de fermentación) hay presencia exclusivamente de ácido acético y ácido propiónico.

A las 24 horas de fermentación se observa que las muestras son metabolizadas por la microbiota fecal produciendo en consecuencia, un aumento de los SCFAs. Específicamente, se destaca que la FC de la galleta 20% 4% generó una producción significativamente mayor ($p < 0,05$) de ácido propiónico en comparación con la FC de su galleta control.

Al alcanzar las 48 horas de fermentación, la producción de todos los ácidos fue en aumento respecto a las 24 horas. La FC de la galleta 20% 4% generó de manera significativamente mayor ($p < 0,05$) ácido acético y ácido propiónico en comparación con la FC de su galleta control.

En el mismo sentido, a las 72 horas de fermentación la producción de ácido acético, propiónico y butírico fue mayor por parte de la FC de la galleta con TGP en comparación con la FC de su galleta control ($p < 0,05$).

Otro aspecto a observar es que la galleta 20% 4% a las 24, 48 y 72 horas produjo más cantidad de ácido propiónico que el propio TGP y que la inulina comercial siendo ésta un prebiótico de referencia utilizado en los estudios de fermentación (Bengoa et al., 2020).

Al comparar la producción de SCFAs mediante la fermentación colónica de diferentes subproductos y frutas se evidencian diferencias en comparación con la producción generada por el TGP. Luego de la fermentación colónica de polvo de cáscara de mango en heces de dos donantes sanos cuyas edades son desconocidas, se observó que a las 24 horas, las concentraciones de ácido acético y ácido butírico alcanzaron valores de $307,31 \pm 5,47$ mM y $32,79 \pm 2,01$ mM, respectivamente (Zahid et al., 2023). En el caso de la fermentación colónica de cáscara de manzana liofilizada en heces de dos donantes sanos de 30 y 33 años, a las 24 horas de la fermentación el ácido acético alcanzó una concentración de $97,53 \pm 9,09$ mM (Hafza Fasiha et al., 2023). Asimismo, en la fermentación colónica de guayaba, en heces de cuatro donantes sanos de 25-35 años, las concentraciones de ácido acético, ácido butírico y propiónico alcanzaron valores de $1,90 \pm 0,23$ mM, $2,84 \pm 0,10$ mM y $1,46 \pm 0,25$, respectivamente (Blancas-Benitez et al., 2022). Dichas concentraciones difieren a las encontradas tras la fermentación colónica de orujo de uva Tannat en heces de niños entre 1 y 3 años, subrayando que tanto la matriz alimentaria como la composición de la microbiota intestinal de los diferentes sujetos de estudio generan perfiles únicos de SCFAs, llevando a diferentes resultados.

Respecto al ácido láctico su producción se vio significativamente aumentada ($p < 0,05$) a las 24, 48 y 72 horas, por la inulina comercial y por la FC de la galleta control, respecto a la FC de la galleta 20% 4% y a la FC del TGP como tal. Se plantea la hipótesis de que la presencia de concentraciones más bajas de ácido láctico en las muestras que contienen TGP podría explicarse mediante la activación de un mecanismo metabólico basado en la alimentación cruzada y el co-metabolismo (Parkar et al., 2013). Se propone que el TGP actúe como un estímulo para las bacterias productoras de ácido láctico, llevándolas a sintetizar dicho ácido hasta alcanzar una concentración crítica, a partir de la cual comienza a ser consumido (Gil-Sánchez et al., 2018). Esta hipótesis encuentra respaldo en informes anteriores que sugieren que los polifenoles que llegan al colon pueden ser

biotransformados por las bacterias fecales, generando productos de descomposición más simples, como los ácidos fenólicos. Se ha observado que esta biotransformación afecta el crecimiento de las principales bacterias intestinales y aumenta la generación de SCFAs (Parkar et al., 2013). Es importante destacar que el ácido láctico producido por bacterias lácticas, como *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, se convierte en sustrato para algunas bacterias estrictamente anaeróbicas del clúster XIVa de Clostridium, favoreciendo la producción de ácido butírico. Además, otros grupos microbianos intestinales aprovechan el ácido láctico para la síntesis de acetato y propionato, dando lugar a la alimentación cruzada (Gil-Sánchez et al., 2018; Parkar et al., 2013). A su vez, esta observación podría explicar la razón detrás de la ausencia de ácido láctico a las 48 y 72 horas y del aumento en las concentraciones de ácido acético y propiónico a las 48 horas, y del ácido butírico adicionalmente a las 72 horas. La razón por la cual la galleta con 20% de TGP haya generado un aumento más pronunciado en la producción de estos ácidos que el mismo TGP podría atribuirse a la posible generación de una sinergia beneficiosa (Parkar et al., 2013) entre los componentes de la galleta y el orujo, que estimula de manera más efectiva la actividad microbiana y la subsiguiente producción de SCFAs.

5.2.5.2. Análisis de la población microbiana

La técnica PCR-DGGE es una técnica útil para examinar la diversidad genética dentro de las comunidades microbianas (Salazar et al., 2008). En este caso se utilizó para evaluar los cambios en las composiciones de grupos microbianos de homogenizados de heces con las diferentes fracciones colónicas de las muestras (FC 20% 4%, FC 4%, y FC TGP) luego de 48 horas de fermentación, siendo éste el tiempo durante el cual se observaron las mayores diferencias en la producción de SCFAs entre las diferentes muestras (**Tabla 11**).

Los resultados del dendrograma (**Figura 22**) muestran que, a nivel de la población microbiana presente en las muestras luego de 48 horas de fermentación, la FC de la galleta con TGP (FC 20% 4%) y la FC de su galleta control (FC 4%) comparten un 69% de similitud genética. Similarmente, se observa que la FC del TGP (FC TGP) comparte mayor similitud genética con el medio basal (MB), siendo un 71% similares de entre ellas.

La similitud genética entre las cuatro muestras (FC 20% 4%, FC 4%, MB y FC TGP) fue del 62%. Por otro lado, las muestras tomadas en el tiempo 0 muestran un porcentaje de similitud más bajo con las muestras tomadas a las 48 horas, siendo este cercano al 50%.

Todos los porcentajes de similitud observados en nuestro estudio distan del 100% entre las muestras. Considerando que 2 perfiles idénticos de microbiota dan como resultado un valor igual al 100% de similitud, mientras que 2 perfiles completamente diferentes dan un valor igual al 0% de similitud (Hurtado Alarcón & Polanía Vorenberg, 2014), no podemos afirmar que ninguna de las muestras sea idéntica a la otra. A su vez, nuestros resultados sugieren que la composición de la microbiota experimenta cambios significativos dependiendo de la muestra que hayan fermentado.

Las diferencias observadas en la producción de SCFAs (**Tabla 11**) entre la FC 20% 4% y la FC 4% pueden atribuirse al porcentaje de bacterias que no comparten similitud (31%), lo que probablemente genere las diferencias en la producción de SCFAs. Los cambios en la diversidad de la microbiota, impulsados por la dieta, pueden dar lugar a variaciones en la producción de SCFAs (Morrison & Preston, 2016).

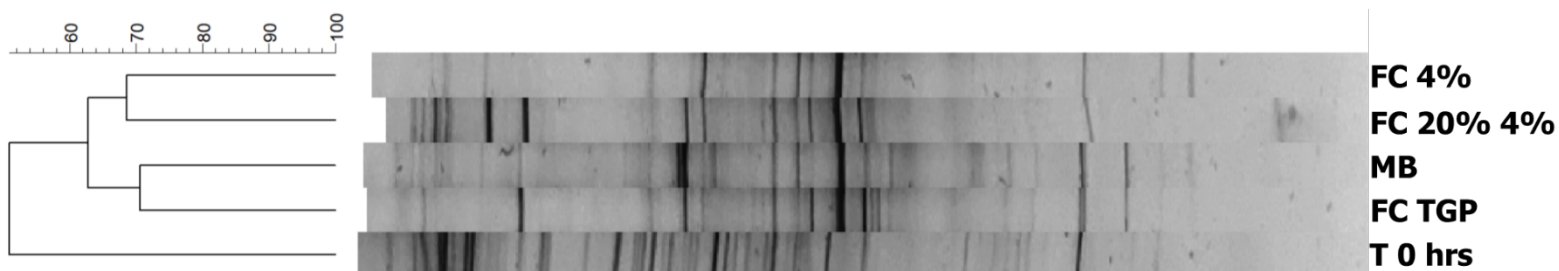


Figura 22. Perfil del DGGE basado en PCR y su respectivo dendrograma del homogeneizado fecal luego de las 48 horas de fermentación con la Fracción Colónica de la galleta con 20% de TGP y 4% de sucralosa (FC 20% 4%), su FC control (FC 4%), la FC del orujo de uva Tannat (FC TGP) y el control con Medio Basal (MB). T 0 hrs: fermentación del TGP a las 0 h. El dendrograma se obtuvo mediante análisis de similitud de perfiles DGGE utilizando el coeficiente de similitud de Dice y análisis de conglomerados GIMP.

5.2.6. Conclusión parcial

La simulación *in vitro* de la digestión gastrointestinal tuvo un impacto en la liberación de compuestos fenólicos de las galletas con distintos porcentajes de orujo de uva Tannat

(TGP). Las Fracciones Bioaccesibles (FB) de estas galletas mantuvieron valores de bioactividad similares, incluso en comparación con las FB de sus respectivas galletas control. En cambio, las Fracciones Colónicas (FC) con mayores porcentajes de TGP (20% y 15%) exhibieron bioactividades mayores. La capacidad antioxidante de las FC fue en su mayoría significativamente superior ($p < 0,05$) a la de las FB, indicando la posibilidad de una retención selectiva de compuestos fenólicos en la FC. En términos de inhibición enzimática, la FC con un contenido más elevado de TGP (20%) demostró una mayor actividad inhibidora ($p < 0,05$), mientras que la FB no presentó una inhibición significativa ($p > 0,05$). Particularmente, se destacó la presencia de trímeros de procianidina en la FC de la galleta 20% 4% pudiendo ser en parte el compuesto capaz de otorgarle las propiedades bioactivas anteriormente mencionadas.

La FC de la galleta con 20% de TGP y 4% de sucralosa mostró una reducción significativa ($p < 0,05$) en la formación de especies reactivas de oxígeno al ser co-administrados con el agente oxidante AAPH en células Caco-2. Sin embargo, esta reducción no se observó cuando las células fueron tratadas únicamente con dicha muestra, lo que indica el potencial de los compuestos presentes en la FC para neutralizar los radicales peróxidos en el compartimento extracelular. Adicionalmente, la producción de óxido nítrico en macrófagos RAW264.7 se vio disminuida por la FC de la galleta con 20% de TGP y 4% de sucralosa sugiriendo, en conjunto, el potencial de los compuestos fenólicos para contrarrestar el estrés oxidativo y nitrosativo.

Aunque se destacó la presencia de trímeros de procianidina en la FC de la galleta con un 20% de TGP y un 4% de sucralosa, este compuesto no mostró capacidad para ser absorbido por las células intestinales Caco-2, mientras que sus monómeros sí lo hicieron.

Además, la fibra dietaria presente en la FC mostró una destacada capacidad para ser fermentada por la microbiota intestinal, lo que generó productos metabólicos con potencial beneficio para la salud del consumidor.

En conclusión, los resultados sugieren que los compuestos fenólicos provenientes del TGP permanecen principalmente en la fracción colónica de las galletas, por lo que, tienen el potencial de impactar positivamente sobre la microbiota intestinal.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se desarrollaron potenciales galletas funcionales con el principal subproducto sólido obtenido de la vinificación del vino tinto Tannat (orujo de uva Tannat). El orujo de uva Tannat (TGP) mostró ser un potencial ingrediente funcional para el desarrollo de galletas con propiedades para promover la buena salud. Las potenciales galletas funcionales con TGP, con las alegaciones nutricionales de “fuente de fibra” y “sin azúcares añadidos”, presentaron no solo una aceptable calidad sensorial en un grupo de 37/101 consumidores, sino que también mostraron capacidad antioxidante además de exhibir capacidades para inhibir enzimas vinculadas al metabolismo de carbohidratos y lípidos. A pesar de que se observó una posible degradación de los compuestos fenólicos durante el proceso de horneado de la galleta, se identificaron, entre otros, 3 compuestos mayoritarios: malvidina-3-O-(6'-p-cumaroil)glucósido, (+)-catequina, y malvidina-3-O-glucósido pudiendo ser los compuestos responsables de otorgarles a las galletas con TGP las propiedades bioactivas anteriormente mencionadas.

En la continuación de las etapas del desarrollo de un potencial alimento funcional, los resultados de las propiedades bioactivas acelulares como celulares de las Fracciones Bioaccesibles (FB) y Fracciones Colónicas (FC) de las galletas sugirieron que los compuestos fenólicos provenientes del TGP permanecen principalmente en las FC de las galletas. Por otro lado, las propiedades bioactivas observadas en las FB de las galletas con TGP, así como sus galletas controles, se atribuyen principalmente a la posible presencia de péptidos bioactivos, liberados durante el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*. En la FC de la galleta con TGP, el compuesto mayoritario fue el trímero de procianidina, sin embargo, no fue este el compuesto absorbido por las células del epitelio intestinal (células Caco-2). En su lugar, se observó la absorción de sus monómeros de catequina y epicatequina, lo que sugiere la posibilidad de absorción, si son liberados en el intestino delgado, o, en su defecto, en el colon.

El hallazgo respecto a la remanencia de los compuestos fenólicos en la FC, sugiere un potencial impacto positivo sobre la microbiota intestinal, respaldado por la observación de una mayor producción de ciertos ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) por la FC de la galleta con TGP en comparación con su galleta control.

A pesar de los resultados prometedores obtenidos, se reconoce la necesidad de estudios adicionales:

En primer lugar, se propone la **identificación de los compuestos fenólicos presentes en la FB**, con el objetivo de validar la hipótesis de que los compuestos no son bioaccesibles al ser incorporados en una galleta. Asimismo, se plantea estudiar los potenciales compuestos presentes en dicha fracción que pudieran ser biodisponibles. Dichos estudios podrían aportar más información sobre los procesos que ocurren durante la digestión que llevan al cambio de las estructuras químicas de los compuestos fenólicos debido a los cambios de pH y a la acción de las enzimas digestivas.

Por otro lado, se debería continuar estudiando la **modulación de la microbiota por la FC**. Se propone la identificación de compuestos fenólicos de bajo peso molecular generados por la fermentación de la microbiota, así como su absorción en células del colon. Además, se sugiere identificar bacterias beneficiosas cuyo crecimiento sea estimulado por estos compuestos, y determinar los potenciales efectos beneficiosos que tanto los compuestos como las bacterias puedan tener en la salud del consumidor.

Respecto, al **producto como tal**, sería necesario evaluar los efectos del procesamiento a escala de la industria galletera, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente trabajo. Esto garantizaría la preservación de las propiedades promotoras de la salud en las galletas que llegan al consumidor final.

Para determinar la dosificación efectiva sería de interés continuar con **estudios *in vivo*** para establecer la cantidad necesaria de consumo para que los efectos beneficiosos se manifiesten en el organismo humano.

En conjunto, este trabajo es alentador para continuar con futuras investigaciones tanto *in vitro* como *in vivo*, con el objetivo último de desarrollar un alimento funcional. Se destaca por un lado el potencial de esta innovación alimentaria no solo en el potencial para la reducción del riesgo de enfermedades crónicas, sino también en su impacto positivo en el medio ambiente. A su vez, se resalta la importancia de profundizar en el conocimiento sobre la Fracción Colónica de los alimentos, que sigue siendo poco

estudiada a nivel global, pero que muestra un gran potencial en la reducción del riesgo a padecer enfermedades crónicas no transmisibles.

7. REFERENCIAS

- Akkarachiyasit, S., Charoenlertkul, P., Yibchok-Anun, S., & Adisakwattana, S. (2010). Inhibitory activities of cyanidin and its glycosides and synergistic effect with acarbose against intestinal α -glucosidase and pancreatic α -amylase. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(9), 3387–3396. <https://doi.org/10.3390/ijms11093387>
- Aleixandre, A., Gil, J. V., Sineiro, J., & Rosell, C. M. (2022). Understanding phenolic acids inhibition of α -amylase and α -glucosidase and influence of reaction conditions. *Food Chemistry*, 372. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131231>
- Almanza-Oliveros, A., Bautista-Hernández, I., Castro-López, C., Aguilar-Zárate, P., Meza-Carranco, Z., Rojas, R., Michel, M., & Martínez-Avila, G. (2024). Grape Pomace—Advances in Its Bioactivity, Health Benefits, and Food Applications. *Foods*, 13(580), 1–21. <https://doi.org/10.3390/foods13040580>
- Almaraz-Sánchez, I., Amaro-Reyes, A., Acosta-Gallegos, J. A., & Mendoza-Sánchez, M. (2022). Processing Agroindustry By-Products for Obtaining Value-Added Products and Reducing Environmental Impact. *Journal of Chemistry*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/3656932>
- Antonic, B., Janciková, S., Dani, D., & Tremolová, B. (2020). Grape Pomace Valorization: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Foods*, 9(11), 1627. <https://doi.org/10.3390/foods9111627>
- Asmat, U., Abad, K., & Ismail, K. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. In *Saudi Pharmaceutical Journal* (Vol. 24, Issue 5, pp. 547–553). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.013>
- Baba, S., Osakabe, N., Natsume, M., Muto, Y., Takizawa, T., & Terao, J. (2001). In Vivo Comparison of the Bioavailability of (1)-Catechin, (2)-Epicatechin and Their Mixture in Orally Administered Rats. *Nutrient Metabolism*, 131(11), 2885–2891. <https://doi.org/10.1093/jn/131.11.2885>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129642>
- Bengoa, A. A., Dardis, C., Gagliarini, N., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2020). Exopolysaccharides From *Lactobacillus paracasei* Isolated From Kefir as Potential Bioactive Compounds for Microbiota Modulation. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.583254>
- Bengoa, A. A., Dueñas, M. T., Prieto, A., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2023). Exopolysaccharide-producing *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir as starter for functional dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1110177>
- Bié, J., Sepodes, B., Fernandes, P. C. B., & Ribeiro, M. H. L. (2023). Polyphenols in Health and Disease: Gut Microbiota, Bioaccessibility, and Bioavailability. *Compounds*, 3(1), 40–72. <https://doi.org/10.3390/compounds3010005>

- Blancas-Benitez, F. J., Pérez-Jiménez, J., Sañudo-Barajas, J. A., Rocha-Guzmán, N. E., González-Aguilar, G. A., Tovar, J., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2022). Indigestible fraction of guava fruit: Phenolic profile, colonic fermentation and effect on HT-29 cells. *Food Bioscience*, 46. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101566>
- Bocsan, I. C., Măgureanu, D. C., Pop, R. M., Levai, A. M., Macovei, Ștefan O., Pătrașca, I. M., Chedea, V. S., & Buzoianu, A. D. (2022). Antioxidant and Anti-Inflammatory Actions of Polyphenols from Red and White Grape Pomace in Ischemic Heart Diseases. *Biomedicines*, 10(10), 1–29. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10102337>
- Boff, J. M., Strasburg, V. J., Ferrari, G. T., de Oliveira Schmidt, H., Manfroi, V., & de Oliveira, V. R. (2022). Chemical, Technological, and Sensory Quality of Pasta and Bakery Products Made with the Addition of Grape Pomace Flour. *Foods*, 11(23). <https://doi.org/10.3390/foods11233812>
- Boido, E., García-Marino, M., Dellacassa, E., Carrau, F., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón, M. T. (2011). Characterisation and evolution of grape polyphenol profiles of *Vitis vinifera* L. cv. Tannat during ripening and vinification. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17(3), 383–393. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2011.00164.x>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, 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), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Calabriso, N., Massaro, M., Scoditti, E., Verri, T., Barca, A., Gerardi, C., Giovinazzo, G., & Carluccio, M. A. (2022). Grape Pomace Extract Attenuates Inflammatory Response in Intestinal Epithelial and Endothelial Cells: Potential Health-Promoting Properties in Bowel Inflammation. *Nutrients*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/nu14061175>
- Caponio, G. R., Minervini, F., Tamma, G., Gambacorta, G., & De Angelis, M. (2023). Promising Application of Grape Pomace and Its Agri-Food Valorization: Source of Bioactive Molecules with Beneficial Effects. *Sustainability (Switzerland)*, 15(11). <https://doi.org/10.3390/su15119075>
- Carullo, G., Spizzirri, U. G., Loizzo, M. R., Leporini, M., Sicari, V., Aiello, F., & Restuccia, D. (2020). Valorization of red grape (*Vitis vinifera* cv. Sangiovese) pomace as functional food ingredient. *Italian Journal of Food Science*, 32(2), 367–385. <https://doi.org/10.14674/IJFS-1758>
- Cavia, M. M., Arlanzón, N., Busto, N., Carrillo, C., & Alonso-Torre, S. R. (2023). The Impact of In Vitro Digestion on the Polyphenol Content and Antioxidant Activity of Spanish Ciders. *Foods*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/foods12091861>
- Chakka, A. K., & Babu, A. S. (2022). Bioactive Compounds of Winery by-products: Extraction Techniques and their Potential Health Benefits. *Applied Food Research*, 2(1), 100058. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100058>
- Chakrabarti, S., Guha, S., & Majumder, K. (2018). Food-derived bioactive peptides in human health: Challenges and opportunities. *Nutrients*, 10(11), 1–17. <https://doi.org/10.3390/nu10111738>
- Chedea, V. S., Macovei, Ștefan O., Bocsan, I. C., Măgureanu, D. C., Levai, A. M., Buzoianu, A. D., & Pop, R. M. (2022). Grape Pomace Polyphenols as a Source of Compounds for Management

of Oxidative Stress and Inflammation—A Possible Alternative for Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs? *Molecules*, 27(20). <https://doi.org/10.3390/molecules27206826>

Chedea, V. S., Palade, L. M., Marin, D. E., Pelmus, R. S., Habeanu, M., Rotar, M. C., Gras, M. A., Pistol, G. C., & Taranu, I. (2018). Intestinal absorption and antioxidant activity of grape pomace polyphenols. *Nutrients*, 10(5), 1–24. <https://doi.org/10.3390/nu10050588>

Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204–7218. www.impactjournals.com/oncotarget/

Chowdhary, P., Gupta, A., Gnansounou, E., Pandey, A., & Chaturvedi, P. (2021). Current trends and possibilities for exploitation of Grape pomace as a potential source for value addition. *Environmental Pollution*, 278. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116796>

Cisneros-Yupanqui, M., Lante, A., Mihaylova, D., Krastanov, A. I., & Rizzi, C. (2023). The α -Amylase and α -Glucosidase Inhibition Capacity of Grape Pomace: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 16(4), 691–703. <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02895-0>

Cui, X., Liu, X., Feng, H., Zhao, S., & Gao, H. (2012). Grape seed proanthocyanidin extracts enhance endothelial nitric oxide synthase expression through 5'-AMP activated protein kinase/sirtuin 1-Krüppel like factor 2 pathway and modulate blood pressure in ouabain induced hypertensive rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35(12), 2192–2197. <https://doi.org/10.1248/bpb.b12-00598>

Das, T., Chatterjee, N., Capanoglu, E., Lorenzo, J. M., Das, A. K., & Dhar, P. (2023). The synergistic ramification of insoluble dietary fiber and associated non-extractable polyphenols on gut microbial population escorting alleviation of lifestyle diseases. *Food Chemistry*, 18. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100697>

Dávalos, A., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2005). Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. *Food Chemistry*, 93(2), 325–330. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.030>

Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S. J., Berenjian, A., & Younes, G. (2019). Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods*, 1–27. <https://doi.org/10.3390/foods8030092>

Debnath, S., Jawahar, S., Muntaj, H., Purushotham, V., Sharmila, G., Sireesha, K., & Babu, M. N. (2019). A Review on Dietary Fiber and its Application. *Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 11(3), 109. <https://doi.org/10.5958/0975-4385.2019.00019.0>

Diet, H., Jara, P., Salgado, L. M., & Reynoso-camacho, R. (2023). Three Varieties of Grape Pomace, with Distinctive Extractable:Non-Extractable Polyphenol Ratios, Differentially Reduce Obesity and Its Complications in Rats Fed a High-Fat High-Fructose Diet. *Foods*, 12. <https://doi.org/10.3390/foods12071370> Academic

Ding, Y., Morozova, K., Scampicchio, M., & Ferrentino, G. (2020). Non-Extractable Polyphenols from Food By-Products: Current Knowledge on Recovery, Characterisation, and Potential Applications. *Processes*, 8. <https://doi.org/10.3390/pr8080925>

Dini, I., & Grumetto, L. (2022). Recent Advances in Natural Polyphenol Research. *Molecules*, 27(24). <https://doi.org/10.3390/molecules27248777>

- Duda-Chodak, A., & Tarko, T. (2023). Possible Side Effects of Polyphenols and Their Interactions with Medicines. *Molecules*, 28(6), 2536. <https://doi.org/10.3390/molecules28062536>
- Dudoit, A., Benbouguerra, N., Richard, T., Hornedo-Ortega, R., Valls-Onayet, J., Coussot, G., & Saucier, C. (2020). α -Glucosidase Inhibitory Activity of Tannat Grape Phenolic Extracts in Relation to Their Ripening Stages. *Biomolecules*, 10(8), 1–18. <https://doi.org/10.3390/biom10081088>
- Dwibedi, V., Jain, S., Singhal, D., Mittal, A., Rath, S. K., & Saxena, S. (2022). Inhibitory activities of grape bioactive compounds against enzymes linked with human diseases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(4), 1399–1417. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11801-9>
- Ed Nignpense, B., Francis, N., Blanchard, C., & Santhakumar, A. B. (2021). Bioaccessibility and bioactivity of cereal polyphenols: A review. *Foods*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/foods10071595>
- Eran Nagar, E., Okun, Z., & Shpigelman, A. (2020). Digestive fate of polyphenols: updated view of the influence of chemical structure and the presence of cell wall material. *Current Opinion in Food Science*, 31, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.10.009>
- Eskicioglu, V., Kamiloglu, S., & Nilufer-Erdil, D. (2015). Antioxidant dietary fibres: Potential functional food ingredients from plant processing by-products. *Czech Journal of Food Sciences*, 33(6), 487–499. <https://doi.org/10.17221/42/2015-CJFS>
- Fassio, F., & Chirilli, C. (2023). The Circular Economy and the Food System: A Review of Principal Measuring Tools. *Sustainability*, 15(13). <https://doi.org/10.3390/su151310179>
- Favre, G., Hermosín-Gutiérrez, I., Piccardo, D., Gómez-Alonso, S., & González-Neves, G. (2019). Selectivity of pigments extraction from grapes and their partial retention in the pomace during red-winemaking. *Food Chemistry*, 277, 391–397. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.10.085>
- Fernandes, I., Freitas, V. de, Reisb, C., & Mateus, N. (2011). A new approach on the gastric absorption of anthocyanins. *Food & Function*, 3. <https://doi.org/10.1039/c2fo10295a>
- Fernández-Fernández, A. M., Dellacassa, E., Medrano-Fernandez, A., & Del Castillo, M. D. (2021). Potential of Red Winemaking Byproducts as Health-Promoting Food Ingredients. Part of the Food Engineering Series book series (FSES). https://doi.org/10.1007/978-3-030-61817-9_11
- Fernández-Fernández, A. M., Dellacassa, E., Nardin, T., Larcher, R., Gambaro, A., Medrano-Fernandez, A., & del Castillo, M. D. (2021). In Vitro Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Citrus Pomaces and Orange Pomace Biscuits. *Molecules*, 27(6). <https://doi.org/https://www.mdpi.com/1420-3049/26/12/3480>
- Fernández-Fernández, A. M., Dellacassa, E., Nardin, T., Larcher, R., Ibañez, C., Terán, D., Gámbaro, A., Medrano-Fernandez, A., & Del Castillo, M. D. (2022). Tannat Grape Skin: A Feasible Ingredient for the Formulation of Snacks with Potential for Reducing the Risk of Diabetes. *Nutrients*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/nu14030419>
- Fernández-Fernández, A. M., Dumay, E., Lazennec, F., Miguez, I., Heinzen, H., Lema, P., López-Pedemonte, T., & Medrano-Fernandez, A. (2021). Antioxidant, antidiabetic, and antiobesity properties, tc7-cell cytotoxicity and uptake of achyrocline satureioides (Marcela) conventional and high pressure-assisted extracts. *Foods*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/foods10040893>

- Fernández-Fernández, A. M., Iriondo-DeHond, A., Dellacassa, E., Medrano-Fernandez, A., & del Castillo, M. D. (2019). Assessment of antioxidant, antidiabetic, antiobesity, and anti-inflammatory properties of a Tannat winemaking by-product. *European Food Research and Technology*, 245(8), 1539–1551. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03252-w>
- Fernández-Fernández, A. M., Iriondo-DeHond, A., Nardin, T., Larcher, R., Dellacassa, E., Medrano-Fernandez, A., & Castillo, M. D. del. (2020). In Vitro Bioaccessibility of Extractable Compounds from Tannat Grape Skin Possessing Health Promoting Properties with Potential to Reduce the Risk of Diabetes. *Foods*, 9(11), 1575. <https://doi.org/10.3390/foods9111575>
- Fernández, A., López-Pedemonte, T., & Medrano, A. (2017). Evaluation of Antioxidant, Antiglycant and ACE-Inhibitory Activity in Enzymatic Hydrolysates of α -Lactalbumin. *Food and Nutrition Sciences*, 08, 84–98. <https://doi.org/10.4236/fns.2017.81006>
- Ferreira, A., Mateus, I., Taketa, D., & Alves, G. A. (2020). Use of agro-industrial residues as potent antioxidant, antiglycation agents, and α -amylase and pancreatic lipase inhibitory activity. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(4), 1–12. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14397>
- Ferrer-Gallego, R., & Silva, P. (2022). The Wine Industry By-Products: Applications for Food Industry and Health Benefits. *Antioxidants*, 11(10), 2025. <https://doi.org/10.3390/antiox111025>
- Filipov, F., Florea, A. M., & Chit, M. A. (2023). Application of Agri-Food By-Products in the Food Industry. *Agriculture*, 13. <https://doi.org/10.2290/agriculture13081559>
- Fusco, W., Lorenzo, M. B., Cintoni, M., Porcari, S., Rinninella, E., Kaitsas, F., Lener, E., Mele, M. C., Gasbarrini, A., Collado, M. C., Cammarota, G., & Ianiro, G. (2023). Short-Chain Fatty-Acid-Producing Bacteria: Key Components of the Human Gut Microbiota. *Nutrients*, 15(9). <https://doi.org/10.3390/nu15092211>
- Gerardi, G., Cavia-Saiz, M., & Muñiz, P. (2022). From winery by-product to healthy product: bioavailability, redox signaling and oxidative stress modulation by wine pomace product. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(27), 7427–7448. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1914542>
- German, J. B. (2022). A rational definition for functional foods: A perspective. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.957516>
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
- Ghazanfar, S., Ali Muhammad, G., Abid, R., Farid, A., Akhtar, N., Batool Akhtar, N., Khalid, S., Okla, M., Al-Amri, S. S., Alwasel, Y. A., & Hameed, Y. (2022). An Overview of Functional Food. In *Functional Food* (Issue May, p. 13). <https://doi.org/10.5772/intechopen.103978>
- Gil-Sánchez, I., Cueva, C., Sanz-Buenhombre, M., Guadarrama, A., Moreno-Arribas, M. V., & Bartolomé, B. (2018). Dynamic gastrointestinal digestion of grape pomace extracts: Bioaccessible phenolic metabolites and impact on human gut microbiota. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.05.005>
- Gómez-García, R., Campos, D. A., Aguilar, C. N., Madureira, A. R., & Pintado, M. (2021). Valorisation of food agro-industrial by-products: From the past to the present and perspectives.

González-Aguilar, G. A., Blancas-Benítez, F. J., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2017). Polyphenols associated with dietary fibers in plant foods: molecular interactions and bioaccessibility. *Current Opinion in Food Science*, 13, 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.03.004>

Guin, R. P. F., Florença, S. G., & Jo, M. (2020). The Link between the Consumer and the Innovations in Food Product Development. *Foods*, 9, 3–5. <https://doi.org/10.3390/foods9091317>

Hafza Fasiha, Z., Chaminda Senaka, R., Zhongxiang, F., & Said, A. (2023). Identification of Phenolics Profile in Freeze-Dried Apple Peel and Their Bioactivities during In Vitro Digestion and Colonic Fermentation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2). <https://doi.org/10.3390/ijms24021514>

He, F., Liang, N. N., Mu, L., Pan, Q. H., Wang, J., Reeves, M. J., & Duan, C. Q. (2012). Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules*, 17(2), 1571–1601. <https://doi.org/10.3390/molecules17021571>

Hogan, S., Zhang, L., Li, J., Sun, S., Canning, C., & Zhou, K. (2010). Antioxidant rich grape pomace extract suppresses postprandial hyperglycemia in diabetic mice by specifically inhibiting alpha-glucosidase. *Nutrition and Metabolism*, 7, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-71>

Hurtado Alarcón, J. C., & Polanía Vorenberg, J. (2014). Técnicas moleculares para la detección de cianobacterias en los embalses Riogrande II y La Fe, Colombia. *Revista de Biología Tropical*, 62(1), 403–419. <https://doi.org/10.15517/rbt.v62i1.12353>

Hussain, S. Z., Beigh, M. A., Qadri, T., Naseer, B., & Zargar, I. (2018). Development of low glycemic index muffins using water chestnut and barley flour.pdf. *Food Processing and Preservation*. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14049>

Hyeoncheol, K., & Xiang, X. (2020). Detection of Total Reactive Oxygen Species in Adherent Cells by 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate Staining. *Journal of Visualized Experiments*, 160(1).

Iftikhar, M., Iftikhar, A., Zhang, H., Gong, L., & Wang, J. (2020). Transport, metabolism and remedial potential of functional food extracts (FFEs) in Caco-2 cells monolayer: A review. *Food Research International*, 136(March), 109240. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109240>

INAVI. (2022). ESTADÍSTICAS DE VIÑEDOS 2022 DATOS NACIONALES. <https://www.inavi.com.uy/uploads/vinedo/e114169ff8dd5bd2a83547b5a8c60636eb4aebcc.pdf>

Iriondo-DeHond, A., Iriondo-Dehond, M., & del Castillo, M. D. (2020). Applications of Compounds from Coffee Processing By-Products. *Biomolecules*, 10(1219). <https://doi.org/10.3390/biom10091219>

Iriondo-DeHond, M., Blázquez-Duff, J. M., del Castillo, M. D., & Miguel, E. (2020). Nutritional quality, sensory analysis and shelf life stability of yogurts containing inulin-type fructans and winery byproducts for sustainable health. *Foods*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/foods9091199>

ISO. (1988). ISO 8589. Sensory analysis: General guidance for the design of test rooms. International Organization for Standardization.

- Iuga, M., & Mironeasa, S. (2020). Potential of grape byproducts as functional ingredients in baked goods and pasta. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(5), 2473–2505. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12597>
- Jaeger, S. R., Beresford, M. K., Paisley, A. G., Antúnez, L., Vidal, L., Cadena, R. S., Giménez, A., & Ares, G. (2015). Check-all-that-apply (CATA) questions for sensory product characterization by consumers: Investigations into the number of terms used in CATA questions. *Food Quality and Preference*, 42, 154–164. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2015.02.003>
- Jakobek, L. (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*, 175, 556–567. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.013>
- Karnopp, A. R., Figueroa, A. M., Los, P. R., Teles, J. C., Simões, D. R. S., Barana, A. C., Kubiaki, F. T., de Oliveira, J. G. B., & Granato, D. (2015). Effects of whole-wheat flour and bordeaux grape pomace (*Vitis labrusca* L.) on the sensory, physicochemical and functional properties of cookies. *Food Science and Technology (Brazil)*, 35(4), 750–756. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.0010>
- Karp, S., Kurek, M., & Wierzbicka, A. (2016). Physical properties of muffins sweetened with steviol glycosides as the sucrose replacement. *Food Science and Biotechnology*, 25(1131), 1591–1596. <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0245-x>
- Khanna, D., Khanna, S., Khanna, P., Kahar, P., & Patel, B. M. (2022). Obesity: A Chronic Low-Grade Inflammation and Its Markers. *Cureus*, 14(2). <https://doi.org/10.7759/cureus.22711>
- Kosinska-Cagnazzo, A., Diering, S., Prim, D., & Andlauer, W. (2015). Identification of bioaccessible and uptaken phenolic compounds from strawberry fruits in in vitro digestion/Caco-2 absorption model. *Food Chemistry*, 107. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.070>
- Kosińska-Cagnazzo, A., Diering, S., Prim, D., & Andlauer, W. (2015). Identification of bioaccessible and uptaken phenolic compounds from strawberry fruits in in vitro digestion/Caco-2 absorption model. *Food Chemistry*, 170, 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.070>
- Kotha, R. R., Tareq, F. S., Yildiz, E., & Luthria, D. L. (2022). Oxidative Stress and Antioxidants—A Critical Review on In Vitro Antioxidant Assays. *Antioxidants*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/antiox11122388>
- Kr, M., & Kepinska, M. (2021). Human Nitric Oxide Synthase — Its Functions , Polymorphisms , and Inhibitors in the Context of Inflammation , Diabetes and Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22010056>
- Ku, Y. S., Ng, M. S., Cheng, S. S., Lo, A. W. Y., Xiao, Z., Shin, T. S., Chung, G., & Lam, H. M. (2020). Understanding the composition, biosynthesis, accumulation and transport of flavonoids in crops for the promotion of crops as healthy sources of flavonoids for human consumption. *Nutrients*, 12(6), 1–23. <https://doi.org/10.3390/nu12061717>
- Kuchtová, V., Kohajdová, Z., Karovi, J., & Lauková, M. (2018). Physical , Textural and Sensory Properties of Cookies Incorporated with Grape Skin and Seed Preparations. 68(4). <https://doi.org/10.2478/pjfn-2018-0004>
- Kumar, S., Krishna Chaitanya, R., & Preedy, V. R. (2017). Assessment of Antioxidant Potential of Dietary Components. In *HIV/AIDS: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809853-0.00020-1>

- Ky, I., Lorrain, B., Kolbas, N., Crozier, A., & Teissedre, P. L. (2014). Wine by-Products: Phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different French grape varieties. *Molecules*, 19(1), 482–506. <https://doi.org/10.3390/molecules19010482>
- Lachowicz, S., Świeca, M., & Pejcz, E. (2020). Improvement of health-promoting functionality of rye bread by fortification with free and microencapsulated powders from amelanchier *alnifolia* nutt. *Antioxidants*, 9(7), 1–24. <https://doi.org/10.3390/antiox9070614>
- Lavelli, V., Sri Harsha, P. S. C., Ferranti, P., Scarafoni, A., & Iametti, S. (2016). Grape skin phenolics as inhibitors of mammalian α -glucosidase and α -amylase - Effect of food matrix and processing on efficacy. *Food and Function*, 7(3), 1655–1663. <https://doi.org/10.1039/c6fo00073h>
- Leonetti, D., Soleti, R., Clere, N., Vergori, L., Jacques, C., Duluc, L., Dourguia, C., Martínez, M. C., & Andriantsitohaina, R. (2018). Extract enriched in flavan-3-ols and mainly procyanidin dimers improves metabolic alterations in a mouse model of obesity-related disorders partially via estrogen receptor α . *Frontiers in Pharmacology*, 9(APR), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00406>
- Lingua, M. S., Theumer, M. G., Kruzynski, P., Wunderlin, D. A., & Baroni, M. V. (2019). 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*, 122(May), 496–505. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.05.022>
- Lippolis, T., Cofano, M., Caponio, G. R., Nunzio, V. De, & Notarnicola, M. (2023). Bioaccessibility and Bioavailability of Diet Polyphenols and Their Modulation of Gut Microbiota. *International Journal of Molecular Sciences*, 24. <https://doi.org/10.3390/ijms24043813>
- Liu, Y. F., Oey, I., Bremer, P., Carne, A., & Silcock, P. (2018). Bioactive peptides derived from egg proteins: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(15), 2508–2530. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1329704>
- Luo, X., Tian, M., Cheng, Y., Ji, C., Hu, S., Liu, H., Lu, J., & Ren, J. (2022). Effects of simulated in vitro gastrointestinal digestion on antioxidant activities and potential bioaccessibility of phenolic compounds from *K. coccinea* fruits. *Frontiers in Nutrition*, 9(December), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1024651>
- Makarewicz, M., Drożdż, I., Tarko, T., & Duda-Chodak, A. (2021). The interactions between polyphenols and microorganisms, especially gut microbiota. *Antioxidants*, 10(2), 1–70. <https://doi.org/10.3390/antiox10020188>
- Martinez-Gonzalez, A. I., Alvarez-Parrilla, E., Díaz-Sánchez, Á. G., de la Rosa, L. A., Núñez-Gastélum, J. A., Vazquez-Flores, A. A., & Gonzalez-Aguilar, G. A. (2017). In vitro inhibition of pancreatic lipase by polyphenols: A kinetic, Fluorescence spectroscopy and molecular docking study. *Food Technology and Biotechnology*, 55(4), 519–530. <https://doi.org/10.17113/ftb.55.04.17.5138>
- Martinez-Gonzalez, A. I., Díaz-Sánchez, Á. G., De La Rosa, L. A., Vargas-Requena, C. L., Bustos-Jaimes, I., & Alvarez-Parrilla, E. (2017). Polyphenolic compounds and digestive enzymes: In vitro non-covalent interactions. *Molecules*, 22(4). <https://doi.org/10.3390/molecules22040669>

- Martínez-Meza, Y., Reynoso-Camacho, R., & Pérez-Jiménez, J. (2020). Non-extractable polyphenols: A relevant group with health effects. In *Dietary Polyphenols* (pp. 60–64). <https://doi.org/10.1002/9781119563754.ch2>
- Martini, S., Conte, A., Cattivelli, A., & Tagliacuzzi, D. (2021). Domestic cooking methods affect the stability and bioaccessibility of dark purple eggplant (*Solanum melongena*) phenolic compounds. *Food Chemistry*, 341(April 2020), 128298. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128298>
- Martins, I. M., Macedo, G. A., & Macedo, J. A. (2020). Biotransformed grape pomace as a potential source of anti-inflammatory polyphenolics: Effects in Caco-2 cells. *Food Bioscience*, 35(80). <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100607>
- Martins, I. M., Macedo, G. A., Macedo, J. A., Roberto, B. S., Chen, Q., Blumberg, J. B., & Chen, C.-Y. O. (2017). Tannase enhances the anti-inflammatory effect of grape pomace in Caco-2 cells treated with IL-1 β . *Journal of Functional Foods*, 29. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.12.011>
- Medrano, M., Gangoiti, M. V., Simonelli, N., & Abraham, A. G. (2020). Kefiran fermentation by human faecal microbiota: Organic acids production and in vitro biological activity. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 24(August), 100229. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2020.100229>
- Meini, M. R., Cabezudo, I., Galetto, C. S., & Romanini, D. (2021). Production of grape pomace extracts with enhanced antioxidant and prebiotic activities through solid-state fermentation by *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. *Food Bioscience*, 42(May), 101168. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101168>
- MERCOSUR. (2012). Reglamento técnico MERCOSUR sobre información nutricional complementaria (declaraciones de propiedades nutricionales). <https://www.impo.com.uy/bases/decretos-internacional/402-2012/1> (accessed on 07 August 2022).
- Merecz-Sadowska, A., Sitarek, P., Kowalczyk, T., Zajdel, K., Jęcek, M., Nowak, P., & Zajdel, R. (2023). Food Anthocyanins: Malvidin and Its Glycosides as Promising Antioxidant and Anti-Inflammatory Agents with Potential Health Benefits. *Nutrients*, 15(13). <https://doi.org/10.3390/nu15133016>
- Moreno-Fernández, S., Garcés-Rimón, M., & Miguel, M. (2020). Egg-derived peptides and hydrolysates: A new bioactive treasure for cardiometabolic diseases. *Trends in Food Science and Technology*, 104(August), 208–218. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.002>
- Morrison, D. J., & Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*, 7(3), 189–200. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082>
- MTSS, INDA, UdelaR, & FQ. (2002). Tabla de composición de alimentos de Uruguay. www.ins.gub.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Tabla de Alimentos.pdf
- Muñoz, A. M. (2002). Sensory evaluation in quality control: An overview, new developments and future opportunities. *Food Quality and Preference*, 13(6), 329–339. [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(02\)00014-9](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(02)00014-9)

- Myhrstad, M. C. W., Tunsjø, H., Charnock, C., & Telle-hansen, V. H. (2020). Dietary Fiber, Gut Microbiota, and Metabolic Regulation—Current Status in Human Randomized Trial. *Nutrien*, 12(859). <https://doi.org/10.3390/nu12030859>
- Nani, A., Murtaza, B., Khan, A. S., Khan, N. A., & Hichami, A. (2021). Antioxidant and Anti-Inflammatory Potential of Polyphenols Contained in Mediterranean Diet in Obesity: Molecular Mechanisms. *Molecules*, 26. <https://doi.org/10.3390/molecules26040985>
- Naz, R., Saqib, F., Awadallah, S., Wahid, M., Latif, M. F., Iqbal, I., & Mubarak, M. S. (2023). Food Polyphenols and Type II Diabetes Mellitus: Pharmacology and Mechanisms. *Molecules*, 28(10). <https://doi.org/10.3390/molecules28103996>
- Negro, C., Aprile, A., Luvisi, A., De Bellis, L., & Miceli, A. (2021). Antioxidant activity and polyphenols characterization of four monovarietal grape pomaces from salento (Apulia, italy). *Antioxidants*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/antiox10091406>
- Nieto, J. A., Fern, I., Siles-s, N., Jaime, L., & Santoyo, S. (2023). Implication of the Polymeric Phenolic Fraction and Matrix Effect on the Antioxidant Activity, Bioaccessibility, and Bioavailability of Grape Stem Extracts. *Molecules*, 28. <https://doi.org/10.3390/molecules28062461>
- Núñez-Gómez, V., González-Barrio, R., & Periago, M. J. (2023). Interaction between Dietary Fibre and Bioactive Compounds in Plant By-Products: Impact on Bioaccessibility and Bioavailability. *Antioxidants*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/antiox12040976>
- Odriozola-Serrano, I., Nogueira, D. P., Esparza, I., Vaz, A. A., Jiménez-Moreno, N., Martín-Belloso, O., & Ancín-Azpilicueta, C. (2023). Stability and Bioaccessibility of Phenolic Compounds in Rosehip Extracts during In Vitro Digestion. *Antioxidants*, 12(5), 1–17. <https://doi.org/10.3390/antiox12051035>
- Oliveira, D. M., Marques, D. R., Kwiatkowski, A., Monteiro, A. R. G., & Clemente, E. (2013). Análise sensorial e caracterização química de cereal matinal enriquecido com farinha da casca e semente de uva. *Acta Scientiarum - Technology*, 35(3), 427–431. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v35i3.13176>
- Oliviero, V., Tagliamonte, S., Ferracane, R., & Vitaglione, P. (2023). Potential antidiabetic effect of muffins formulated with different protein hydrolysates: Role of bioactive peptides formed during digestion. *Journal of Functional Foods*, 109(July), 105810. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105810>
- Olt, V., Báez, J., Curbelo, R., Boido, E., Amarillo, M., Gámbaro, A., Alborés, S., García, N. G., Cesio, M. V., Heinzen, H., Dellacassa, E., Fernández-Fernández, A. M., & Medrano, A. (2023). Tannat grape pomace as an ingredient for potential functional biscuits: bioactive compound identification , in vitro bioactivity , food safety , and sensory evaluation. *Frontiers in Nutrition*. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1241105>
- Olvera-Rosales, L. B., Cruz-Guerrero, A. E., Ramírez-Moreno, E., Quintero-Lira, A., Contreras-López, E., Jaimez-Ordaz, J., Castañeda-Ovando, A., Añorve-Morga, J., Calderón-Ramos, Z. G., Arias-Rico, J., & González-Olivares, L. G. (2021). Impact of the gut microbiota balance on the health-disease relationship: The importance of consuming probiotics and prebiotics. *Foods*, 10(6), 1–28. <https://doi.org/10.3390/foods10061261>
- Ortega-Heras, M., Gómez, I., Pablos-Alcalde, S. de, & González-Sanjosé, M. L. (2019). Application of the Just-About-Right Scales in the Development of New Healthy Whole-Wheat Muffins by the

Addition of a Product Obtained from White and Red Grape Pomace. *Foods*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/foods8090419>

Ou, J., Wang, M., Zheng, J., & Ou, S. (2019). Positive and negative effects of polyphenol incorporation in baked foods. In *Food Chemistry* (Vol. 284, pp. 90–99). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.096>

Parkar, S. G., Trower, T. M., & Stevenson, D. E. (2013). Fecal microbial metabolism of polyphenols and its effects on human gut microbiota. *Anaerobe*, 23, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.07.009>

Patricia, J., & Dhamoon, A. (2022). Physiology, Digestion. *StatPearls*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31334962/>

Peña-Vázquez, G. I., Dominguez-Fernández, M. T., Camacho-Zamora, B. D., Hernandez-Salazar, M., Urías-Orona, V., De Peña, M. P., & de la Garza, A. L. (2022). In vitro simulated gastrointestinal digestion impacts bioaccessibility and bioactivity of Sweet orange (*Citrus sinensis*) phenolic compounds. *Journal of Functional Foods*, 88. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2021.104891>

Pérez-Jiménez, J., Díaz-Rubio, M. E., & Saura-Calixto, F. (2013). Non-extractable polyphenols, a major dietary antioxidant: Occurrence, metabolic fate and health effects. *Nutrition Research Reviews*, 26(2), 118–129. <https://doi.org/10.1017/S0954422413000097>

Pinto, D., Moreira, M. M., Švarc-Gajić, J., Vallverdú-Queralt, A., Brezo-Borjan, T., Delerue-Matos, C., & Rodrigues, F. (2023). In-vitro gastrointestinal digestion of functional cookies enriched with chestnut shells extract: Effects on phenolic composition, bioaccessibility, bioactivity, and α -amylase inhibition. *Food Bioscience*, 53(March). <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102766>

Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>

Plumb, J., Durazzo, A., Lucarini, M., Camilli, E., Turrini, A., Marletta, L., & Finglas, P. (2020). Extractable and non-extractable antioxidants composition in the ebasis database: A key tool for dietary assessment in human health and disease research. *Nutrients*, 12(11), 1–15. <https://doi.org/10.3390/nu12113405>

Quirós-Sauceda, A. E., Palafox-Carlos, H., Sáyago-Ayerdi, S. G., Ayala-Zavala, J. F., Bello-Perez, L. A., Álvarez-Parrilla, E., De La Rosa, L. A., González-Córdova, A. F., & González-Aguilar, G. A. (2014). Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: Interaction and possible effect after ingestion. *Food and Function*, 5(6), 1063–1072. <https://doi.org/10.1039/c4fo00073k>

Rainero, G., Bianchi, F., Rizzi, C., Cervini, M., Giuberti, G., & Simonato, B. (2022). Breadstick fortification with red grape pomace: effect on nutritional, technological and sensory properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(6), 2545–2552. <https://doi.org/10.1002/JSFA.11596>

Rauf, A., Imran, M., Abu-Izneid, T., Iahtisham-Ul-Haq, Patel, S., Pan, X., Naz, S., Sanches Silva, A., Saeed, F., & Rasul Suleria, H. A. (2019). Proanthocyanidins: A comprehensive review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 116(February). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108999>

- Ray, S. K., & Mukherjee, S. (2021). Evolving Interplay Between Dietary Polyphenols and Gut Microbiota—An Emerging Importance in Healthcare. *Frontiers in Nutrition*, 8(May), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.634944>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rocchetti, G., Rizzi, C., Cervini, M., Rainero, G., Bianchi, F., Giuberti, G., Lucini, L., & Simonato, B. (2021). Impact of grape pomace powder on the phenolic bioaccessibility and on in vitro starch digestibility of wheat based bread. *Foods*, 10(3), 1–12. <https://doi.org/10.3390/foods10030507>
- Rodrigues, R., Gando-Ferreira, L., & Quina, M. (2022). Increasing Value of Winery Residues through Integrated Biorefinery Processes: A Review. *Molecules*, 27(15). <https://doi.org/10.3390/molecules27154709>
- Rudrapal, M., Khairnar, S. J., Khan, J., Dukhyil, A. Bin, Ansari, M. A., Alomary, M. N., Alshabrm, F. M., Palai, S., Deb, P. K., & Devi, R. (2022). Dietary Polyphenols and Their Role in Oxidative Stress-Induced Human Diseases: Insights Into Protective Effects, Antioxidant Potentials and Mechanism(s) of Action. *Frontiers in Pharmacology*, 13(February), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.806470>
- Rupasinghe, H. P. V., Joshi, V. K., Smith, A., & Parmar, I. (2017). Chapter 3 - Chemistry of Fruit Wines. In *Science and Technology of Fruit Wine Production*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800850-8.00003-X>
- Sakundech, K., Chompoosan, C., Tuchpramuk, P., Boonsorn, T., & Aengwanich, W. (2020). The influence of duration on pain stress, oxidative stress, and total antioxidant power status in female dogs undergoing ovariohysterectomy. *Veterinary World*, 13(1), 160–164. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.160-164>
- Salazar-López, N. J., Salmerón-Ruiz, M. L., Domínguez-Avila, J. A., Villegas-Ochoa, M. A., Ayala-Zavala, J. F., & González-Aguila, G. . (2021). Phenolic compounds from 'Hass' avocado peel are retained in the indigestible fraction after an in vitro gastrointestinal digestion (pp. 1982–1990). <https://doi.org/10.1007/S11694-020-00794-6>
- Salazar, N., Gueimonde, M., Hernández-Barranco, A. M., Ruas-Madiedo, P., & De Los Reyes-Gavilán, C. G. (2008). Exopolysaccharides produced by intestinal Bifidobacterium strains act as fermentable substrates for human intestinal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(15), 4737–4745. <https://doi.org/10.1128/AEM.00325-08>
- Sales, A. L., Iriondo-DeHond, A., DePaula, J., Ribeiro, M., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Miguel, M. A. L., del Castillo, M. D., & Farah, A. (2023). Intracellular Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects and Bioactive Profiles of Coffee Cascara and Black Tea Kombucha Beverages. *Foods*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/foods12091905>
- Saura-Calixto, F. (1998). Antioxidant Dietary Fiber Product: A New Concept and a Potential Food Ingredient. *Food Chemistry*, 46. <https://doi.org/10.1021/jf9803841>
- Sensoy, I. (2021). A review on the food digestion in the digestive tract and the used in vitro models. *Current Research in Food Science*, 4(February), 308–319. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.04.004>

- Serra, A., MacI, A., Romero, M. P., Valls, J., Bladé, C., Arola, L., & Motilva, M. J. (2010). Bioavailability of procyanidin dimers and trimers and matrix food effects in in vitro and in vivo models. *British Journal of Nutrition*, 103(7), 944–952. <https://doi.org/10.1017/S0007114509992741>
- Serreli, G., & Deiana, M. (2023). Role of Dietary Polyphenols in the Activity and Expression of Nitric Oxide Synthases: A Review. *Antioxidants*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/antiox12010147>
- Siddeeg, A., AlKehayez, N. M., Abu-Hiamed, H. A., Al-Sanea, E. A., & AL-Farga, A. M. (2021). Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(3), 1633–1644. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.064>
- Silva, Y. P., Bernardi, A., & Frozza, R. L. (2020). The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Frontiers in Endocrinology*, 11(January), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00025>
- Spinei, M., & Oroian, M. (2021). The Potential of Grape Pomace Varieties as a Dietary Source of Pectic Substances. *Foods*, 10(867). <https://doi.org/10.3390/foods10040867>
- Sporin, M., Avbelj, M., Kovac, B., & Mozina, S. S. (2017). Quality characteristics of wheat flour dough and bread containing grape pomace flour. *Food Science and Technology International*, 24, 251–263. <https://doi.org/10.1177/1082013217745398>
- Stevens, J., Miranda, C., Wolthers, K., Schimerlik, M., Deinzer, M., & Buhler, D. (2002). Identification and in Vitro Biological Activities of Hop Proanthocyanidins: Inhibition of nNOS Activity and Scavenging of Reactive Nitrogen Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3435–3443. <https://doi.org/10.1021/jf0116202>
- Tamargo, A., Cueva, C., Silva, M., Molinero, N., Miralles, B., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2022). Gastrointestinal co-digestion of wine polyphenols with glucose/whey proteins affects their bioaccessibility and impact on colonic microbiota. *Food Research International*, 155(July 2021). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111010>
- Tamasiga, P., Miri, T., Onyeaka, H., & Hart, A. (2022). Food Waste and Circular Economy: Challenges and Opportunities. *Sustainability (Switzerland)*, 14(16). <https://doi.org/10.3390/su14169896>
- Tena, N., & Asuero, A. G. (2020). Antioxidant capacity of anthocyanins and other vegetal pigments. *Antioxidants*, 9(8), 1–3. <https://doi.org/10.3390/antiox9080665>
- Theagarajan, R., Malur Narayanaswamy, L., Dutta, S., Moses, J. A., & Chinnaswamy, A. (2019). Valorisation of grape pomace (cv. Muscat) for development of functional cookies. *International Journal of Food Science and Technology*, 54(4), 1299–1305. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14119>
- Tolve, R., Pasini, G., Vignale, F., Favati, F., & Simonato, B. (2020). Effect of grape pomace addition on the technological, sensory, and nutritional properties of durum wheat pasta. *Foods*, 9(3), 1–11. <https://doi.org/10.3390/foods9030354>
- Tonolo, F., Coletta, S., Fiorese, F., Grinzato, A., Albanesi, M., Folda, A., Ferro, S., Mario, A. De, Piazza, I., Mammucari, C., Arrigoni, G., Marin, O., Cestonaro, G., Nataloni, L., Costanzo, E., Lodovichi, C., Pia, M., & Bernard, M. De. (2023). Sunflower seed-derived bioactive peptides show

antioxidant and anti-inflammatory activity: From in silico simulation to the animal model. *Food Chemistry*, 439(August 2023), 138124. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138124>

Tonolo, F., Grinzato, A., Bindoli, A., & Rigobello, M. P. (2023). From In Silico to a Cellular Model: Molecular Docking Approach to Evaluate Antioxidant Bioactive Peptides. *Antioxidants*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/antiox12030665>

Torres-León, C., Ramírez-Guzman, N., Londoño-Hernandez, L., Martínez-Medina, G. A., Díaz-Herrera, R., Navarro-Macias, V., Alvarez-Pérez, O. B., Picazo, B., Villarreal-Vázquez, M., Ascacio-Valdes, J., & Aguilar, C. N. (2018). Food Waste and Byproducts: An Opportunity to Minimize Malnutrition and Hunger in Developing Countries. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2(September), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2018.00052>

Troilo, M., Difonzo, G., Paradiso, V. M., Pasqualone, A., & Caponio, F. (2022). Grape Pomace as Innovative Flour for the Formulation of Functional Muffins: How Particle Size Affects the Nutritional, Textural and Sensory Properties. *Foods*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/foods11121799>

United Nations. (2015). Sustainable Development Goals. THE 17 GOALS. <https://sdgs.un.org/goals>

Unusan, N. (2020). Proanthocyanidins in grape seeds: An updated review of their health benefits and potential uses in the food industry. *Journal of Functional Foods*, 67(November 2019), 103861. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103861>

Valencia-Hernandez, L. J., Wong-Paz, J. E., Ascacio-Valdés, J. A., Chávez-González, M. L., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. (2021). Procyanidins: From agro-industrial waste to food as bioactive molecules. *Foods*, 10(12), 1–33. <https://doi.org/10.3390/foods10123152>

Van Hul, M., Geurts, L., Plovier, H., Druart, C., Everard, A., Ståhlman, M., Rhimi, M., Chira, K., Teissedre, P., Delzenne, N. M., Maguin, E., Guilbot, A., Brochot, A., Gérard, P., Bäckhed, F., Cani, P. D., Ståhlman, M., Rhimi, M., Chira, K., ... Nm, D. (2017). Reduced obesity, diabetes, and steatosis upon cinnamon and grape pomace are associated with changes in gut microbiota and markers of gut barrier. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 314(4), 334–352. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00107.2017>

Veronese, N., Solmi, M., Caruso, M. G., Giannelli, G., Osella, A. R., Evangelou, E., Maggi, S., Fontana, L., Stubbs, B., & Tzoulaki, I. (2018). Dietary fiber and health outcomes: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *American Journal of Clinical Nutrition*, 107(3), 436–444. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqx082>

Walker, J. L., & Littlewood, R. (2023). Dietary Strategies for Obesity Dietary Strategies for Obesity. *Nutrients*, 15(4275). <https://doi.org/10.3390/nu15194275>

Wang, S., Dong, S., Zhang, R., Shao, H., & Liu, Y. (2014). Effects of proanthocyanidins on porcine pancreatic lipase: Conformation, activity, kinetics and thermodynamics. *Process Biochemistry*, 49(2), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.10.018>

Williams, B. A., Mikkelsen, D., Flanagan, B. M., & Gidley, M. J. (2019). “Dietary fibre”: Moving beyond the “soluble/insoluble” classification for monogastric nutrition, with an emphasis on humans and pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0350-9>

- Williamson, G., & Clifford, M. N. (2010). Colonic metabolites of berry polyphenols: The missing link to biological activity? *British Journal of Nutrition*, 104(SUPPL.3), 48–66. <https://doi.org/10.1017/S0007114510003946>
- Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., Combrzyński, M., Nowakowska, D., & Matwijczuk, A. (2020). Influence of in vitro digestion on composition, bioaccessibility and antioxidant activity of food polyphenols—a non-systematic review. *Nutrients*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/nu12051401>
- World Health Organization. (2023). Noncommunicable diseases. *Noncommunicable Diseases*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
- Yang, C., Han, Y., Tian, X., Sajid, M., Mehmood, S., Wang, H., & Li, H. (2022). Phenolic composition of grape pomace and its metabolism. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–17. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2146048>
- Yang, C., Tian, X., Han, Y., Shi, X., Wang, H., & Li, H. (2023). Extracts of Dunkelfelder Grape Seeds and Peel Increase the Metabolic Rate and Reduce Fat Deposition in Mice Maintained on a High-Fat Diet. *Foods*, 12(17). <https://doi.org/10.3390/foods12173251>
- Yi, W., Akoh, C. C., Fischer, J., & Krewer, G. (2006). Absorption of anthocyanins from blueberry extracts by Caco-2 human intestinal cell monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(15), 5651–5658. <https://doi.org/10.1021/jf0531959>
- Yu, J., & Ahmedna, M. (2013). Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(2), 221–237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x>
- Zahid, H. F., Ali, A., Legione, A. R., Ranadheera, C. S., Fang, Z., Dunshea, F. R., & Ajlouni, S. (2023). Probiotic Yoghurt Enriched with Mango Peel Powder : Biotransformation of Phenolics and Modulation of Metabolomic Outputs after In Vitro Digestion and Colonic Fermentation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24. <https://doi.org/10.3390/ijms24108560>
- Zhang, W., Qi, S., Xue, X., Naggar, Y. Al, & Wu, L. (2021). Understanding the Gastrointestinal Protective Effects of Polyphenols using Foodomics-Based Approaches. *Frontiers in Immunology*, 12, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.671150>
- Zhu, F., Du, B., Zheng, L., & Li, J. (2015). Advance on the bioactivity and potential applications of dietary fibre from grape pomace. *Food Chemistry*, 186, 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.057>
- Zhu, G., Fang, Q., Zhu, F., Huang, D., & Yang, C. (2021). Structure and Function of Pancreatic Lipase-Related Protein 2 and Its Relationship With Pathological States. *Frontiers in Genetics*, 12, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.693538>

8. ANEXO

A continuación, se detallan las referencias de las presentaciones en congresos científicos, seguidas de las publicaciones en revistas científicas que surgieron de esta tesis:

2022. Olt, V.; Báez, J.; Fernández-Fernández, A.M.; Medrano, A. Development of potential functional biscuits with the incorporation of Tannat grape pomace and sweetener. E-Poster. The 3rd International E-Conference on Foods: Food, Microbiome, and Health. Online.

2023. Olt, V., Curbelo, R., Boido, E., Dellacassa, E., Fernández-Fernández, A. M., & Medrano, A. Identified phenolic compounds of the colonic fraction from biscuits with Tannat grape pomace present potential to improve gut health. Presentación oral en inglés. "The First International Conference on Antioxidants: Sources, Methods, Health Benefits and Industrial Applications". Barcelona, España.

2023. Olt, V., Fernández-Fernández, A. M., Báez, J.; Alborés, S., Gerez García, N., Cesio, M.V., Heinzen, H. & Medrano, A. Orujo de uva Tannat una alternativa sostenible como ingrediente para el desarrollo de alimentos inocuos y nutritivos. 2023. Poster. XVIII Congreso argentino de ciencia y tecnología de alimentos. Buenos Aires, Argentina.

2023. Olt, V.; Curbelo, R.; Boido, E.; Dellacassa, E.; Fernández-Fernández, A. M.; Medrano, A. Compuestos fenólicos identificados de la fracción colónica de galletas con orujo de uva Tannat presentan potencial para mejorar la salud intestinal. 2023. Poster. 8° Encuentro Nacional de Química (ENAGUI). Montevideo, Uruguay.

2023. Olt, V.; Bengoa, A.; Dardis, C.; Báez, J.; Abraham, A.; Garrote, G.; Fernández-Fernández, A. M.; Medrano, A. Orujo de uva Tannat como potencial prebiótico y su efecto en la salud intestinal. Primer Congreso Latinoamericano de Sustentabilidad y Sostenibilidad de Alimentos (CLASS). Montevideo, Uruguay.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Elena Ibañez,
Spanish National Research Council
(CSIC), Spain

REVIEWED BY

Liana Claudia Salanta,
University of Agricultural Sciences and
Veterinary Medicine Cluj-Napoca, Romania
Vasiliki Kachrimanidou,
Ionian University, Greece

*CORRESPONDENCE

Adriana Maite Fernández-Fernández
✉ afernandez@fq.edu.uy
Alejandra Medrano
✉ amedrano@fq.edu.uy

†These authors share last authorship

RECEIVED 16 June 2023

ACCEPTED 16 August 2023

PUBLISHED 07 September 2023

CITATION

Olt V, Báez J, Curbelo R, Boido E, Amarillo M, Gámbaro A, Alborés S, Gerez García N, Cesio MV, Heinzen H, Dellacassa E, Fernández-Fernández AM and Medrano A (2023) Tannat grape pomace as an ingredient for potential functional biscuits: bioactive compound identification, *in vitro* bioactivity, food safety, and sensory evaluation. *Front. Nutr.* 10:1241105. doi: 10.3389/fnut.2023.1241105

COPYRIGHT

© 2023 Olt, Báez, Curbelo, Boido, Amarillo, Gámbaro, Alborés, Gerez García, Cesio, Heinzen, Dellacassa, Fernández-Fernández and Medrano. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Tannat grape pomace as an ingredient for potential functional biscuits: bioactive compound identification, *in vitro* bioactivity, food safety, and sensory evaluation

Victoria Olt^{1,2}, Jessica Báez^{1,2}, Romina Curbelo³, Eduardo Boido⁴, Miguel Amarillo⁵, Adriana Gámbaro⁵, Silvana Alborés⁶, Natalia Gerez García⁷, María Verónica Cesio⁷, Horacio Heinzen⁷, Eduardo Dellacassa³, Adriana Maite Fernández-Fernández^{1*†} and Alejandra Medrano^{1*†}

¹Laboratorio de Bioactividad y Nanotecnología de Alimentos, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ²Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ³Área Analítica Orgánica, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ⁴Área Enología y Biotecnología de la Fermentación, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ⁵Área Sensorial, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ⁶Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ⁷Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Grape pomace, the main by-product of wine process, shows high potential for the development of functional foods, being a natural source of bioactive compounds and dietary fiber. Thus, the present study proposes the development of five potential functional biscuits. The five formulations were achieved by varying the Tannat grape pomace powder (TGP, 10–20% w/w total wet dough) and sweetener sucralose (2–4% w/w total wet dough) content through a factorial design with central points. TGP microbiological and pesticides analysis were performed as a food safety requirement. Identification of bioactive compounds by HPLC-DAD-MS, *in vitro* bioactivity (total phenol content, antioxidant by ABTS and ORAC-FL, antidiabetic and antiobesity by inhibition of α -glucosidase and pancreatic lipase, respectively) and sensory properties of the biscuits were evaluated. TGP microbiological and pesticides showed values within food safety criteria. Sensory profiles of TGP biscuits were obtained, showing biscuits with 20% TGP good sensory quality (7.3, scale 1–9) in a cluster of 37 out of 101 consumers. TGP addition in biscuits had a significant ($p < 0.05$) effect on total phenolic content (0.893–1.858 mg GAE/g biscuit) and bioactive properties when compared to controls: 11.467–50.491 and 4.342–50.912 μ mol TE/g biscuit for ABTS and ORAC-FL, respectively; inhibition of α -glucosidase and pancreatic lipase, IC₅₀ 35.572–64.268 and 7.197–47.135 mg/mL, respectively. HPLC-DAD-MS results showed all the identified phenolic compounds in 20/4% biscuit (TGP/sucralose%) were degraded during baking. Malvidin-3-O-(6'-p-coumaroyl) glucoside, (+)-catechin, malvidin-3-O-glucoside, and (–)-epicatechin were the main phenolic compounds (in descending order of content) found. The bioactive

properties could be attributed to the remaining phenolic compounds in the biscuits. In conclusion, TGP biscuits seemed to be a promising functional food with potential for ameliorating oxidative stress, glucose and fatty acids levels with good sensory quality.

KEYWORDS

bioactive compound identification, food safety, functional biscuits, sensory analysis, Tannat grape pomace, wine byproduct, *in vitro* bioactivity

1. Introduction

Large amounts of agro-industrial by-products are generated each year because of agricultural crop processing. Despite their nutritional value, these by-products are often disregarded by industries, leading to their accumulation and becoming environmental pollutants (1). Among these industries, the wine industry stands out as a major contributor to agricultural waste. During wine elaboration, per 1,000 kg of grapes processed, ~200 kg of solid residues, mainly grape pomace composed of seeds and skin, are generated as a result. As a yearly outcome, it is estimated that 20 million tons of wine by-products are generated (2, 3). Therefore, it can be estimated that 6,000,000 kg of Tannat grape pomace were generated in 2022 (4). *Vitis vinifera* cv Tannat is a red grape variety that is currently cultivated in a few places in the world. It has become the emblematic wine variety of Uruguay, accounting for 1,575 hectares of the area of *V. vinifera* grapes planted in 2022 (4), representing 27% of the total wine grapes. Uruguay was the only country in the Americas where this grape was found 25 years ago. In recent years, several studies have been conducted in the country to better characterize its wine quality potential and to better understand the chemical composition of the grapes and wines (5, 6).

From the circular economy concept perspective, residues from wineries show high potential for new food products' formulation (2, 7). Wine and grape juice industrial residues are composed of high amounts of dietary fiber and phytochemicals, mainly phenolic compounds, including phenolic acids, flavonoids, and stilbenes (2, 8). Grape pomace polyphenolic content depends on the vinification method and contact time of the juice with skins, representing basic information for its application and profitability (9). These phenolic compounds have potentially beneficial effects on human health, being responsible for bioactive properties such as antioxidant, antiviral, antimicrobial, and anti-inflammatory activities depending on the grape variety (10). Specifically, Tannat grapes have a unique phenolic profile (5). Moreover, the hydroalcoholic-acid extract of Tannat skin separated from grape pomace showed potential antioxidant, anti-inflammatory, antidiabetic, and antiobesity properties (11). Suitable strategies to manage and valorize the wine by-products both to reduce pollution and promote sustainable bioeconomy growth have emerged thanks to the circular economy concept (1). Among these strategies, grape pomace is being used as a substrate to cultivate oyster mushrooms as a way to promote the nutritional value of the spent substrate for ruminants (12). Moreover, due to the current trend

toward natural and healthy food ingredients, grape pomace has gained recognition as an interesting ingredient that can serve as a substitute for synthetic antioxidants and enhance the nutritional value of the final product (13–15). The incorporation of grape pomace into food for the development of functional foods or its application as a nutritional supplement is being assessed for health promotion (8). Nowadays, as a consequence of consumers being more aware in their food consumption and health, industries and researchers are striving to develop innovative healthy food products keeping the product as natural as possible (16). The fortification of food products with functional ingredients, such as grape pomace, presents a promising approach to improve both consumer health and sensory properties (17). In this context, baked goods (muffins, breads, and brownies) have been prepared with wine grape pomace flour as a source of antioxidant dietary fiber with good consumers' acceptance (18). Among these baked products, biscuits are widely consumed in the world as a bakery snack; hence, they have emerged as excellent carriers for delivering essential nutrients and bioactive compounds such as polyphenols, vitamins, and pigments (17). However, to our knowledge, there are no studies on the identification of grape pomace phenolic compounds after baking to associate their presence to the bioactive properties of grape pomace food products.

Considering this context, the aim of this study was to develop different formulations of potential functional biscuits with the nutrition claims "source of fiber" and "no-added sugar" with Tannat grape pomace (TGP) incorporation, as a novel and sustainable ingredient for enhancing the nutritional composition, and explore their preventive effects against various chronic diseases. Thus, the biscuits were characterized in terms of their sensory and bioactive properties identifying the compounds that can potentially exert beneficial effects on consumers' health.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Tannat (*Vitis vinifera* cv. Tannat) grape pomace (TGP) was provided by Bouza SA wine cellar (Montevideo, Uruguay). Chemicals for physicochemical assays such as dimethyl sulfoxide (DMSO), Folin reagent, gallic acid, 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), fluorescein (FL) disodium salt, 2,2'-azo-bis(2-methylpropionamide)dihydrochloride (AAPH), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylch-roman-2-acid (Trolox), α -glucosidase,

4-methylumbelliferyl- α -D-glucopyranoside (4-MUF), pancreatic lipase, 4-methylumbelliferyl-oleate (4-MUO), $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, and buffer solutions Na_2HPO_4 and KH_2PO_4 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All chemical reagents were of reagent grade. The ingredients to elaborate the biscuits (wheat flour, eggs, baking powder, sucralose, salt, and sunflower oil) were purchased from local stores in Montevideo (Uruguay).

For the GC-MS/MS, a Shimadzu GC-2010 Plus was equipped with an RTX-5 column of 30 m with a $0.25\ \mu$ layer, coupled to a TQ8050 MS/MS system, with the AART software for retention time adjustment (Shimadzu Co, Kyoto, Japan).

2.2. Tannat grape pomace (TGP) proximal analysis

Proximal analysis was carried out as described by AOAC (19) determining protein, fat, total dietary fiber, moisture, ashes, and total carbohydrates (by difference using protein, moisture, fat, and ash contents).

2.3. Sample preparation

2.3.1. Tannat grape pomace powder

TGP was dried at 50°C in a conventional oven until constant weight (24 h). Dried TGP was subjected to size reduction using a domestic coffee grinder to achieve a particle size like that of commercial flour.

2.3.2. Biscuit elaboration

Five formulations were prepared following a factorial design with central points to optimize % TGP and % sucralose according to the response variables: total phenol content, ABTS, and ORAC-FL. Two levels of substitution of wheat flour by TGP powder (10 and 20% w/w of total wet mass) and sucralose sweetener (2 and 4% w/w of total wet mass) were selected, as well as a central point with 15% of substitution by TGP powder and 3% of sucralose. In addition, control biscuits with different percentages of sucralose (2, 3, and 4% w/w in the total wet mass) and without substitution of TGP powder were formulated for comparison purposes. The formulations with the amounts of the ingredients are detailed in Table 1. The dough was prepared by mixing all the ingredients and then cut into equal shapes and sizes. They were baked in a conventional oven at 180°C for 12 min. The biscuits were subjected to size reduction obtaining a homogenous powder, packaged, and stored at freezer temperature (-20°C) for further bioactivity analysis.

Multiple regression analysis was performed fitting to the linear model with the following equation:

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (1)$$

where β_0 indicates the intersection point, β_1 and β_2 the linear coefficients corresponding to % TGP and % sucralose, and β_{12} for the interaction between the independent variables (factors %TGP and % sucralose).

2.4. Food safety

Food safety analyses were carried out (microbiological and pesticide analyses) to determine TGP powder's suitability for human consumption as a food ingredient. Microbiological analysis was carried out following the limits established in the current regulations (20) and bibliographic data (21). The analyses were performed based on the methods described in the US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (22, 23). The performed analyses were as follows: plate count of viable aerobic mesophiles, total coliforms, and fungi expressed in colony-forming units per gram of sample (cfu/g); Salmonella spp. search in a 25 g sample; and enterobacteria search in a 1 g sample.

Pesticide screening analysis of 107 residues in TGP was performed following an adaptation of the 21.01 official method and SANTE guidelines (24). In brief, 2 g of TGP powder was hydrated with 8 mL of deionized water and let stand for 30 min. Then, 10 mL of ACN was added and vortexed for 20 min at maximum speed. For the phase separation, 4 g of MgSO_4 and 1 g of NaCl were added and agitated manually for 2 min and centrifuged at $3,000\ g$ for 5 min. For the clean-up step, 125 mg of PSA and 100 mg of GCB were added to 4 mL of the ACN phase. The suspension was vortexed for 3 min and centrifuged for another 5 min. Two milliliters of the supernatant were taken, and the organic solvent evaporated under a gentle stream of N_2 and the residue redissolved in 1 mL AcOEt solution was injected in the GC-MS/MS. Five replicas of the matrix extract were performed. Two were injected in the GC-MS/MS as such, and the other three were spiked with a mix of pesticide standards to check compound detectability at 0.01 mg/kg level. For pesticide identification, the criteria of the SANTE guidelines were followed: The retention time should not drift <0.1 min, and two transitions, the qualifier and the quantifier ions, for each parent were selected. The ions should completely overlap, having the same shape. The qualifier ion should have a $S/N > 3$ whereas the quantifier a $S/N > 10$. For screening purposes, only the qualifier was evaluated. As no pesticide was detected in the blank injections, a recovery experiment was performed: The mix of pesticides was added to 2 g TGP powder in a crystallizer and mixed, and the solvent was allowed to evaporate overnight. The sample was then extracted as above.

2.5. Sensory evaluation

Sensory analysis performed by semi-trained judges and consumers was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The study was reviewed and approved by the Ethics Committee for Research in Human Beings of the Faculty of Chemistry (Universidad de la República, Montevideo, Uruguay). Subjects gave written informed consent to participate in the study and were informed of the possibility of withdrawing from the study at any time.

2.5.1. Sensory profile analysis

The five formulated biscuits were evaluated by 15 semi-trained judges (aged 30–60 years). The biscuits were presented to each judge at the same time and could be selected in the order the

TABLE 1 Amounts of the ingredients in the different formulations of biscuits.

Ingredient (%)	Biscuit formulations (TGP/sweetener%)							
	20/4%	20/2%	15/3%	10/4%	10/2%	4%	3%	2%
Wheat flour	47.17	49.17	54.17	57.17	59.17	67.17	69.17	74.94
TGP powder	20	20	15	10	10	0	0	0
Baking powder	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Salt	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
Sucralose	4	2	3	4	2	4	3	2
Eggs	14	14	14	14	14	14	14	14
Oil	14.25	14.25	14.25	14.25	14.25	14.25	14.25	14.25
Water	Qty Req	Qty Req	Qty Req	Qty Req	Qty Req	Qty Req	Qty Req	Qty Req

Qty Req: quantity of water required to form the dough.

judge wished. They had to select the most appropriate attributes to describe them applying a rapid descriptive methodology (Flash Profile). Once the descriptive terms had been established, the five biscuits were evaluated using 10 cm long unstructured scales. The different attributes were anchored with “nil/not at all” and “high.” The evaluations were carried out in a sensory evaluation laboratory designed according to ISO 8589 (25).

2.5.2. Consumer test

Consumer sensory analysis was carried out with the formulations (three biscuits) that showed significant differences in the sensory profile analysis by studying acceptability and perception. The three biscuits were presented to 101 consumers (aged 18–65 years) following a balanced complete block design. Consumers were recruited from the city of Montevideo (Uruguay) based on their interest in participating. For each biscuit, consumers indicate their overall liking using a 9-point hedonic scale. In addition, they had to answer check-all-that-apply (CATA) + just about right (JAR) questions (26) composed of 27 terms. Then, consumers responded to a brief survey of sociodemographic data.

2.6. Bioactivity assays

2.6.1. Total phenol content

Total phenol content (TPC) was determined by the Folin-Ciocalteu method as described by Fernández-Fernández et al. (11). Measurement was performed after 30 min of incubation in the dark at 750 nm in a microplate reader (Thermo Scientific Multiskan FC model, Massachusetts, USA). The results were expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE)/g of sample.

2.6.2. Antioxidant capacity

Antioxidant capacity was determined by ABTS and ORAC-FL methods as described by Fernández-Fernández et al. (11). In both cases, the calibration curve was performed with Trolox (0.25–1.5 mM for ABTS and 0.01–0.08 mM for ORAC-FL), and the results were expressed as μmol of Trolox Equivalents (TE)/g of sample.

2.6.3. Antidiabetic and antiobesity capacities

Inhibition of α -glucosidase and pancreatic lipase was assessed by measuring fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emission}} = 460 \text{ nm}$) of the substrate (4-MUF- α -D-glucopyranoside) hydrolyzed by α -glucosidase and of the substrate (4-methylumbelliferyl-oleate) hydrolyzed by pancreatic lipase, respectively, for 30 min in a Varioskan Lux fluorimeter microplate reader (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) (11). The results were expressed as the concentration of biscuit causing 50% inhibition (IC_{50} , mg/mL) of α -glucosidase/pancreatic lipase.

2.7. Identification of Tannat grape pomace phenolic compounds

Bioactive compounds were extracted following the method described by Peña-Vázquez et al. (27) with some modifications (28). In brief, 50 mg of each sample was mixed with 1 mL of methanol/acidified water (0.1% formic acid) (80:20 v/v), followed by 90 min sonication, 1 min vortex, and centrifugation (10 min at 9,500 rpm), and the supernatant was collected. Afterwards, a re-extraction of the residue was performed with 0.5 mL of methanol/acidified water (80:20 v/v), 25 min sonication, 1 min vortex and centrifugation (10 min at 9500 rpm). Extracts were mixed and stored at -20°C for further LC-MS analysis.

LC-MS analyses were carried out as described by Curbelo et al. (29) with some modifications (28). Phenolic compounds' separation was performed using an HPLC Kinetex C18-EVO reverse phase C18 column (5 μm particle size, 150 \times 4.6 mm i.d., Phenomenex, California, USA) thermostated at 35°C . Mobile phase composition included: (A) 0.1% trifluoroacetic acid and (B) acetonitrile. The gradient was from 0 to 100% A for 3 min, from 4 to 30% B for 50 min, from 30 to 98% B for 5 min, and isocratic 98% B for 2 min, at a flow rate of 1.3 mL/min. Detection was performed at 280 nm. LC-MS analyses were assessed using a Shimadzu Triple Quadrupole MS detector (Shimadzu, Tokyo, Japan) using an electrospray ionization (ESI) interface (source voltage: 2.50 kV, capillary temperature: 250°C). Spectra were recorded in positive ion mode between m/z 100 and 2,000.

2.8. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate. Analyses were performed by analysis of variance (ANOVA), and significant differences were determined by the Tukey test ($p < 0.05$) using Infostat v. 2020 program. The results were expressed as means \pm standard deviation ($n = 3$). For response surface graphs and multiple regression analysis, Statistica v. 7.0 and STATGRAPHICS Centurion 19 programs were used, respectively.

Sensory statistical analysis was performed by ANOVA (taking into account the judges, samples, and replicates) using XL-Stat 2021 software (Addinsoft, NY). For sensory profile analysis, the interactions assessor*biscuit and assessor*replicate were considered as variation factors, determining mean ratings and honest significant differences (Tukey test, $p \leq 0.05$). Principal component analysis (PCA) of mean ratings was used to illustrate the relationship between variables and samples. For conducting consumers' sensory analysis, hierarchical cluster analysis was employed to identify consumer groups based on their overall liking of the products. The clusters were formed using Ward's aggregation criterion and the calculation of Euclidean distances between data points. To ascertain differences in the frequency distribution of gender, age, marital status, education, and consumption of non-nutritive sweeteners among clusters, the chi-square statistical test was used. Finally, an ANOVA was conducted on the overall liking data, considering sample, cluster, and their interaction as variation factors, determining mean ratings and honestly significant differences (Tukey test, $p \leq 0.05$). Frequency of mention was obtained for the CATA questionnaire followed by performing the Cochran Q-test and Bonferroni test to identify significant differences in the selection of the terms. For each cluster, a correspondence factor analysis (CA) was performed on the contingency table obtained considering only significant terms according to the Cochran Q-test.

3. Results and discussion

3.1. Proximal analysis

TGP proximal analysis showed high dietary fiber content (Table 2) being beneficial for the development of food products with high nutritional quality. Dietary fiber content was higher than the one reported for Tannat grape skin (11) meaning the seeds contributed to fiber content. Compared to grape pomace from other grape varieties, TGP showed similar content to Manto Negro and higher content than Cabernet Sauvignon, Morio Muscat, Muller Thurgau, Merlot, and Pinot Noir (30). Regarding protein content, TGP showed similar values to Tannat grape skin, Manto Negro, Cabernet Sauvignon, Merlot, and Pinot Noir; surprisingly, fat content was higher than all these grape pomaces. TGP showed similar ash content to Cabernet Sauvignon, Merlot, and Pinot Noir (30). Altogether, the macro-component content shows the potential of TGP as an ingredient for the development of high-nutritional quality foods.

TABLE 2 Tannat grape pomace proximal analysis.

Components	g/100 g*
Proteins	13.13 \pm 0.25
Lipids	8.97 \pm 0.54
Total carbohydrates	70.63
Dietary fiber	63.82 \pm 2.25
Ashes	7.27 \pm 0.16

*Values on a dry matter basis.

3.2. Food safety

TGP microbiological analyses showed a viable aerobic mesophilic count of 1×10^3 cfu/g, total coliform count lower than 3 cfu/g, absence of enterobacteria in 1g, absence of *Salmonella* spp. in 25g, and filamentous fungi count lower than 10 cfu/g. These results meet the food safety criteria stated by the Uruguayan regulations and bibliographic data (20, 21).

Regarding the analysis of pesticide residue of TGP, there was no detection of pesticides. There is no methodology available in the literature for TGP determination. The analytical methodology for sample preparation was based on the 21.01 methodology, the QuEChERS acetate-buffered method, with the addition of GCB in the clean-up step to eliminate the excess planar polyphenols (31). For pesticide residue determination, the suitability of the screening methodology assayed was checked, being possible to ensure the detection of the searched compounds. On the other hand, the usefulness of the sample preparation method was confirmed through recovery experiments at 0.01 mg/kg level, where the 107 pesticides searched for were detected. As no pesticide was detected, in the TGP sample, no further quantitative assays were performed.

Thus, TGP powder can be used as a food ingredient, making formulated biscuits an excellent food product for TGP bioactive compounds delivery for potentially enhancing consumers' health.

3.3. Sensory evaluation

3.3.1. Sensory profile analysis

The sensory profiles of the five biscuit formulations (Figure 1) are shown in Table 3. The biscuits with TGP powder increased significantly ($p < 0.005$) the intensity of all the sensory attributes evaluated, which could have an impact on the consumers' acceptability. The biscuits with 20% of TGP powder were described as harder, with a more intense color, with a greater grape flavor, more acid, with greater flavor intensity and persistence, and with a greater aftertaste than the biscuits with 10% of TGP powder. Some of these attributes have been used to describe the sensory profile of other grape pomace baked goods, showing increased acidity and hardness with the by-product addition (32). The biscuits with 4% of sweetener were perceived as significantly sweeter ($p = 0.0066$) than the samples with the same amount of TGP powder but with



FIGURE 1
Biscuits evaluated by semi-trained judges.

TABLE 3 Mean values of biscuit intensities of the evaluated sensory attributes.

Attributes	Biscuit formulations (TGP/sweetener%)					Significance level
	20/4%	20/2%	15/3%	10/4%	10/2%	
Color intensity	7.3 a	7.1 a	5.5 b	3.2 c	2.8 c	<0.0001
Hardness	6.0 a	5.7 a	3.9 b	2.0 c	1.8 c	<0.0001
Crispness	6.4 a	5.4 a,b	4.4 b	2.2 c	2.0 c	<0.0001
Dryness	5.7 a	4.8 a,b,c	5.2 a,b	3.2 c	3.6 b,c	0.0028
Sandness	5.7 a	5.0 a	4.6 a,b	3.8 a,b	2.6 b	0.0007
Sweetness	5.5 a	3.6 b	4.8 a,b	4.8 a	2.7 b	0.0066
Acid flavor	6.7 a	6.0 a	3.9 b	2.1 b,c	1.8 c	<0.0001
Grape flavor	6.4 a	5.9 a,b	4.0 b,c	2.6 c	3.0 c	<0.0001
Flavor intensity	6.5 a	5.6 a,b	4.2 b,c	3.0 c,d	2.4 d	<0.0001
Aftertaste	3.9 a	2.9 a,b	2.6 a,b	2.2 a,b	1.6 b	0.0348
Flavor persistence	5.0 a	5.2 a,b	3.3 b,c	3.0 c	1.7 c	<0.0001

Values within one row with different lowercase letters are significantly different according to the Tukey test ($p < 0.05$).

2% sweetener. The biscuits with 15% of TGP powder showed an intermediate sensory profile.

PCA was performed on the sensory data of the five evaluated biscuit formulations. The first two components (PC1 and PC2) accounted for 96.3% of the total variance (88.1 and 8.2% contributed by PC1 and PC2, respectively; data not shown). The color intensity, hardness, crispness, dryness, sandiness, sourness, grape flavor, flavor intensity, aftertaste, and flavor persistence contributed positively to PC1. These sensory descriptors were strongly correlated with each other. For PC2, sweetness contributed positively.

Three formulations of biscuits (20/4, 15/3, and 10/2%) showed significant differences in the sensory profile analysis by semi-trained judges, so they were selected for consumer analysis.

3.3.2. Consumer test

The overall liking was 5.0, 5.3, and 5.2 for 20/4, 15/3, and 10/2% biscuits. These results were in agreement with those reported by Fernández-Fernández et al. (13) for Tannat grape skin biscuits and with data reported by Kuchtová et al. (33) attributing the decrease in overall liking to the astringent and bitter taste due to the increase in the amount of by-product. The identification of consumer groups was achieved by the hierarchical cluster analysis

according to the overall liking toward the products. They were identified as clusters 1, 2, and 3, composed of 37, 27, and 37 consumers, respectively (Table 4), considering a minimum score of 6.0 on a 9-point hedonic scale as the lowest acceptable score for a product to be considered commercially viable (34). It is noteworthy that due to the low number of consumers in each cluster, the results may have limitations.

Consumers of Cluster 1 showed significant differences ($p = 0.0091$) between the samples for the biscuit with the highest amount of TGP powder, the preferred one over the other two samples. The 20/4% biscuit, preferred by this group, was described as having adequate hardness, smooth texture, adequate sweetness, intense flavor, acid flavor, grape flavor, and being delicious. On the other hand, consumers of Cluster 2 preferred the biscuit with the least amount of TGP powder over the other two samples ($p < 0.0001$). The general liking decreased significantly with the addition of higher amounts of TGP powder showing quite low values of acceptability (below the commercial limit). The perception of these samples regarding negative attributes, such as not very sweet, dry, with aftertaste and strange taste, explain the low acceptability assigned by this group of consumers to all biscuits, indicating that Cluster 2 cannot be considered as potential consumers of TGP biscuits. Among the consumers of Cluster 3, significant differences ($p < 0.0001$) were also found between the evaluated samples, with

TABLE 4 Mean overall liking scores regarding cluster and biscuit formulation.

Biscuit formulation	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Significance level
	<i>n</i> = 37	<i>n</i> = 27	<i>n</i> = 37	
10/2%	6.5 b A	5.3 a B	3.7 b C	<0.0001
15/3%	6.6 b A	4.2 b B	5.0 a B	<0.0001
20/4%	7.3 a A	2.6 c C	5.6 a B	<0.0001
Significance level	0.0091	<0.0001	<0.0001	

Lowercase letters in one column indicate significant differences according to the Tukey test ($p \leq 0.05$). Capital letters in one row indicate significant differences according to the Tukey test ($p \leq 0.05$).

the preference of the two biscuits with the highest amount of TGP powder over the sample 10/2%. This group assigned low acceptability scores to the biscuits evaluated, mainly to the ones that contained the least amount of TGP powder; therefore, they could be considered potential consumers of the biscuits with the highest % of TGP powder. The terms most used by consumers in Cluster 3 were adequate color, adequate hardness, slightly sweet, mild flavor, acid flavor, grape flavor, and strange flavor.

The attributes that were mentioned by the consumers and their frequency of mention for TGP biscuits were in agreement with Tannat grape skin biscuits (13), which were described as follows: from adequate color to too dark, of adequate crunch and being dry, adequate sweetness, with intense and persistent flavor, acid flavor, with adequate grape flavor.

3.4. Bioactivity assays

3.4.1. Total phenol content (TPC) and antioxidant capacity

TPC and antioxidant capacity increased in the biscuits with the substitution of wheat flour for TGP powder compared with their control biscuits (Table 5). The biscuit with a higher percentage of TGP and sucralose (20/4%) showed the highest values of TPC and antioxidant capacity ($p < 0.05$). These results indicated that the phenolic compounds present in the TGP powder remained with antioxidant capacity in the biscuits after baking. These results are in agreement with those reported by Theagarajan et al. (35) where biscuits added with 6% grape pomace powder showed significantly higher total polyphenols and antioxidant capacity compared with biscuits with 4% of grape pomace powder and a control biscuit without the incorporation of the by-product. Similarly, the fortification of cakes with 4, 6, 8, and 10% of Grape Pomace Powder (GPP) resulted in a significant increase in the antioxidant capacity measured by DPPH and FRAP assays, compared to the control cakes with no addition of GPP. The same trend was observed by the authors, where the cake with 10% of GPP showed higher antioxidant capacity (36). Accordingly, the Tannat grape skin biscuit (20% w/w Tannat grape skin of total dough wet mass) showed increased antioxidant capacity compared to the control biscuit ($p < 0.05$) (13).

Figure 2 surface plots show the relationship between the TGP percentage and that of sucralose incorporated into the biscuits, presenting a linear association with the response variables. Multiple regression analysis fitted to Equation 1 resulted in the

following three equations (Table 6): $TPC = 1.38 + 0.24 * TGP$; $ABTS = 35.02 + 9.43 * TGP$; $ORAC-FL = 34.76 + 8.19 * TGP$. The non-significant coefficients (p -value > 0.05) were taken out from the analysis, showing that the response variables were only dependent on factor %TGP and positively influenced by this factor. The factor %sucralose was non-significant showing no significant influence on the response variables. R^2 values indicated that the variability in TPC, ABTS, and ORAC-FL is poorly explained by the fitting of the model because of the low values ($< 80\%$). The highest TPC and antioxidant capacity corresponded to the biscuit with the highest substitution of wheat flour by TGP powder (20%).

3.4.2. Antidiabetic and antiobesity capacities

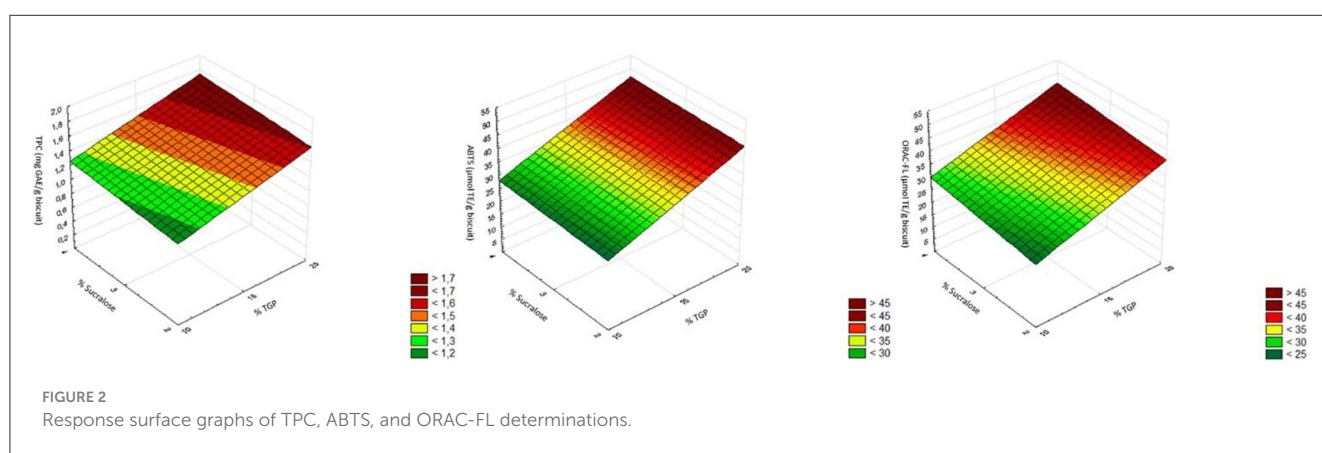
The use of enzyme inhibitors in the prevention and treatment of diseases is applied in diabetes to reduce postprandial glucose levels by the inhibition of carbohydrate-hydrolyzing enzymes such as α -glucosidase. In the same way, inhibition of lipases related to triacylglycerol absorption is used to reduce fat levels and thus treat obesity (37). Our results suggested greater inhibition of α -glucosidase and pancreatic lipase with the highest substitution of wheat flour by TGP powder (20%) in biscuits (Table 7), showing the potential of TGP powder as a functional ingredient for regulating hyperlipidemia and hyperglycemia. These inhibitory capacities may be attributed to grape phenolic compounds (37).

When analyzing the TGP phenolic composition in flavan-3-ols, flavonols, and anthocyanins, as well as taking into account similar food matrices to TGP, an association of α -glucosidase and pancreatic lipase inhibition capacities can be made. Among anthocyanins, cyanidin and its glycosides have demonstrated α -glucosidase inhibition capacity (38). Proanthocyanidins have been reported for non-competitively inhibiting pancreatic lipase inducing its aggregation and subsequent stabilization of the aggregates (39). Regarding similar food matrices' phenolic composition to TGP, extracts of anthocyanin sources, which present flavonol glycosides (berry extracts, from black currant and rowanberry) such as TGP, have shown α -glucosidase inhibition capacity (40, 41). In addition, red fruit extracts from aronia (*Aronia melanocarpa*, A.), pomegranate (*Punica granatum* L., P.), and red grape (*Vitis vinifera*, RG) have shown high α -glucosidase inhibition capacity, being the anthocyanins, flavonols, and ellagitannins responsible for the inhibition (42). Particularly, the fractionation of the red grape extract showed higher inhibition capacity for the polymeric fraction (tannins such as condensed flavan-3-ols)

TABLE 5 Total phenol content (TPC) and antioxidant capacity were measured by ABTS and ORAC-FL of the different formulations of biscuits.

Samples		TPC (mg GAE/g biscuit)	ABTS (μ mol TE/g biscuit)	ORAC-FL (μ mol TE/g biscuit)
TGP biscuit	20/4%	1.858 \pm 0.043 ^c	50.491 \pm 1.863 ^c	50.912 \pm 3.656 ^d
	20/2%	1.575 \pm 0.029 ^d	43.808 \pm 1.505 ^d	37.111 \pm 2.465 ^c
	15/3%	1.242 \pm 0.014 ^c	31.888 \pm 2.366 ^c	33.332 \pm 2.012 ^{bc}
	10/4%	1.225 \pm 0.119 ^c	26.697 \pm 1.364 ^b	25.976 \pm 2.211 ^b
	10/2%	1.250 \pm 0.023 ^c	29.882 \pm 2.057 ^c	29.291 \pm 5.718 ^b
Control biscuit	4%	1.059 \pm 0.048 ^b	14.433 \pm 1.099 ^a	7.994 \pm 1.147 ^a
	3%	0.999 \pm 0.023 ^b	11.467 \pm 2.101 ^a	6.910 \pm 1.841 ^a
	2%	0.893 \pm 0.048 ^a	12.134 \pm 0.514 ^a	4.342 \pm 1.790 ^a

The results are expressed as mean values \pm SD. Different letters indicate significant differences (Tukey, $p < 0.05$) between the mean values in the same analysis (per column).



when compared to anthocyanin (malvidin-3-glucoside, petunidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside, malvidin-3-acetylglucoside, coumaroyl derivatives of anthocyanins) and copigment fractions (hexoside of coumaric acid and isorhamnetin) (42). Other anthocyanin sources, blackthorn, açai, and maqui blends, have been reported for inhibiting pancreatic lipase activity being negatively correlated with their anthocyanin content, as well as showing α -glucosidase inhibition capacity (43). Tannin-rich extracts from persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) have shown α -glucosidase inhibition capacity as well as glucose uptake and transport reduction in the Caco-2 cells model (44). A phenolic-concentrated extract of native Chilean red strawberry (*Fragaria chilensis* ssp. *chilensis* f. *patagonica*) has shown α -glucosidase ($IC_{50} = 0.80 \mu\text{g/mL}$) and pancreatic lipase (41.36% inhibition at $50 \mu\text{g/mL}$) inhibition capacities (45). Phenolic extracts from Canadian lentil cultivars (*Lens culinaris*), mainly composed of flavonoids (kaempferol glycosides, catechin/epicatechin glucosides and procyanidins) such as TGP, presented good α -glucosidase and pancreatic lipase inhibition capacities (46). The main responsible for these exerted capacities may be the flavonols (46).

On the other hand, berry seeds such as maqui seeds, which are composed of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, tocotrienols, tocopherols, and sterols, have shown α -glucosidase ($IC_{50} > 265.9 \mu\text{g/mL}$) and pancreatic lipase ($IC_{50} > 71.33 \mu\text{g/mL}$) inhibition capacities (47). Fruit fractions of saskatoon berry showed

TABLE 6 Multiple regression analysis results for TPC, ABTS, and ORAC-FL response variables.

Coefficients	TPC	ABTS	ORAC-FL
Constant	1.38	35.02	34.76
%TGP	0.24	9.43	8.19
%sucralose	-	-	-
%TGP*%sucralose	-	-	-
R^2 (%)	61.49	77.10	66.22
Adjusted R^2	53.79	72.53	59.46
p -value	0.037	0.009	0.026

similar IC_{50} values to the current work for α -glucosidase ($IC_{50} > 23.60 \text{ mg/mL}$) and pancreatic lipase ($IC_{50} > 81.90 \text{ mg/mL}$) inhibition capacities (48). In contrast, Merlot grape pomace extract presented no inhibition of α -glucosidase probably because of the low concentrations that were tested ($< 250 \mu\text{g/mL}$) (49). Particularly, Tannat grapes have shown α -glucosidase inhibition capacity (50), as well as Tannat grape skin ($IC_{50} = 11.67 \text{ mg/mL}$) (13) and their extracts (lowest $IC_{50} = 0.8886 \text{ mg/mL}$) (11). Moreover, a Tannat grape skin extract has shown pancreatic lipase inhibition capacity ($IC_{50} = 2.431 \text{ mg/mL}$) (11). Extracts from red grape pomace, skin, and seeds presented α -glucosidase inhibition capacity (IC_{50} of 0.55, 0.30, and 0.36 mg/mL , respectively), as well

TABLE 7 α -glucosidase and pancreatic lipase inhibitory activity of the biscuit formulations.

Samples		α -glucosidase inhibition	Lipase inhibition
		IC ₅₀ (mg/mL)	IC ₅₀ (mg/mL)
TGP biscuits	20/4%	35.572 ± 0.549 ^a	7.197 ± 0.811 ^a
	20/2%	43.148 ± 5.223 ^{ab}	8.573 ± 1.505 ^a
	15/3%	55.415 ± 1.019 ^{bc}	10.355 ± 1.129 ^a
	10/4%	45.351 ± 6.963 ^{ab}	37.434 ± 0.988 ^b
	10/2%	64.268 ± 3.248 ^c	47.135 ± 2.443 ^c
Control biscuits	4%	58.528 ± 6.655 ^{bc}	N I
	3%	69.257 ± 8.016 ^c	N I
	2%	107.447 ± 13.827 ^d	N I

The results are expressed as mean values ± SD. N I, No inhibition. Different letters indicate significant differences (Tukey, $p < 0.05$) between the mean values in the same analysis (per column).

as yogurt fortified with those extracts (51). In sum, TGP inhibition capacities can be attributed to grape phenolic compounds.

Regarding the inhibition capacities of foods with the addition of these phenolic compounds, the results of α -glucosidase inhibition are in agreement with the ones of a flatbread enriched with a source of oligomeric proanthocyanidins (white grape skin), showing increased activity compared to non-enriched food (52). The authors found that the inhibition increase was lower than expected (based on the grape skin added amount), probably because of proanthocyanin/protein complexes' formation with food matrix components which lowered solubility, hence reducing their accessibility for bioactivity determinations. Moreover, the baking temperature might have caused changes in those complexes as well as partial proanthocyanidins degradation (52). These statements are in agreement with the current results. Phenolic compounds can interact with food matrix macro-components such as lipids, proteins, and carbohydrates, changing their structure with subsequent changes in their bioactivity (53) by impairing their interaction with these enzymes.

In another work, blackcurrant pomace (by-product from fruit juice production) showed inhibition of glucose release during *in vitro* digestion when added to muffin formulations, by inhibiting starch digestive enzymes, counteracting pre-gelatinized starch (extruded wheat flour) hyperglycemic effect (54). Moreover, rye bread fortification with powders from Saskatoon berry fruits led to an increased inhibitory activity against α -glucosidase and pancreatic lipase (55). Kefir fortified with UAE-derived Sangiovese skin extract (from red grape pomace) presented α -glucosidase and pancreatic lipase inhibition (56). Grape seed powder inhibited cream (containing milk fat) lipolysis, whereas no inhibition was observed for beef fat, indicating that lipolysis may be determined by the dietary fat source of a meal (57). As to biscuits added with other food matrixes, a coffee fiber-containing biscuit showed a reduction of α -glucosidase activity (58). Biscuits with orange pomace have shown lower IC₅₀ values (<25 mg/mL, higher α -glucosidase inhibition capacity) (59) than TGP biscuits. In contrast,

particularly biscuits with 20% of Tannat grape skin have shown higher IC₅₀ values (>55 mg/mL, lower α -glucosidase inhibition capacity) (13) than 20% TGP biscuits.

Although red grape by-products have shown these capacities (11, 13, 60), to our knowledge, it is the first time that they have been determined in biscuits with grape pomace.

The biscuit 20/4% was the one that presented the highest antioxidant, antidiabetic, and antiobesity properties; therefore, LC-MS analysis was performed on this formulation.

3.5. Identification of Tannat grape pomace phenolic compounds

Regarding TGP phenolic profile (Table 8), flavan-3-ol, flavonol, and anthocyanin profiles agree with those of the grape not submitted to the vinification process (5). Particularly, the anthocyanin profile and part of the flavonol profile agree with the one from Tannat grape skin from grape pomace (13) and Tannat grape pomace (61), showing the characteristic p-coumaroyl derivatives of Tannat grape.

LC-MS results (Table 8) showed that the main phenolic compounds present in TGP biscuit were malvidin-3-O-(6'-p-coumaroyl)glucoside, (+)-catechin, malvidin-3-O-glucoside, (-)-epicatechin, procyanidin dimer B3, and quercetin-3-O-glucoside, in descendent order, in contrast with TGP that showed malvidin-3-O-(6'-p-coumaroyl)glucoside, procyanidin trimer, malvidin-3-O-glucoside, (-)-epicatechin, and p-coumaroyl hexose (28). Data also demonstrated that all the identified phenolic compounds suffered degradation to some extent during baking (about 84% phenolic compounds' loss calculated by area relationships) or linking to the macromolecules composing biscuit ingredients. These results are in agreement with other bioactive compounds' sources incorporated into biscuit formulations (62). Particularly, procyanidin trimer (Rt = 10.3–10.6 min) presented the highest degradation during baking. By contrast, procyanidin dimer B3, (+)-catechin, and quercetin-3-O-glucoside presented the lowest degradation during baking (50–65% loss of the total area) than the other compounds when compared to the total loss (84%). In this sense, proanthocyanidins have been shown to degrade during heating (100–140.8°C) (63). The smaller loss of procyanidin dimer B3 and (+)-catechin may be explained by their release with the degradation/hydrolysis of procyanidin trimer. The remaining compounds may be responsible for the exhibited antioxidant, α -glucosidase, and pancreatic lipase inhibitory capacities by the biscuits (37). Particularly, phenolic compounds with B rings, such as the ones identified in the TGP biscuit, present inhibition of carbohydrate-hydrolytic enzymes (37). In addition, proanthocyanidins which are mainly present in grape seeds possess many bioactive properties (63).

In brief, the results obtained allow us to hypothesize that the phenolic compounds initially present in TGP could have suffered modifications in their chemical structure by baking temperature or could have ended up forming stronger bonds with the biscuit ingredients during baking that could have impaired the phenolic compounds' extraction during the extraction for analysis (52, 64). Procyanidins and anthocyanins have been shown to degrade at

TABLE 8 Data on the identification of phenolic compounds composing TGP and TGP biscuit.

	Compound	TGP		TGP biscuit (20% w/w)		
		Rt (min)	Area	Rt (min)	Area	
Chromatogram 280 nm	Phenolic acids	Cis-caftaric acid	6.496	34,450		
		Trans-caftaric acid	6.893	90,891		
		Protocatechuic acid	8.730	225,597		
		Trans-coutaric acid	12.313	265,757		
		p-coumaroyl hexose	12.457	573,977		
	Flavan-3-ols	Procyanidin trimer C2	4.628	39,983	4.376	974
		Procyanidin dimer B1	7.453	181,179	7.040	3,393
		Procyanidin dimer B3	8.022	303,632	7.562	26,005
		(+)-catechin	8.306	436,692	7.905	53,780
		Procyanidin trimer	9.104	199,322	8.852	7,084
		Procyanidin trimer	10.608	1,127,900	10.315	6,897
		Procyanidin dimer B4	11.459	328,747	10.862	2,461
		Procyanidin dimer B6	11.832	204,148	11.617	15,877
		(-)-epicatechin	12.457	839,734	11.835	32,999
		Procyanidin dimer galloylated	15.757	107,028	14.862	1,430
		Procyanidin trimer	16.024	89,969		
		Procyanidin trimer	16.324	341,893		
		Procyanidin dimer B2	17.158	161,716		
		Procyanidin dimer galloylated	17.579	302,107		
		Procyanidin dimer B7	22.827	200,876		
	Flavonols	Myricetin-3-O-galactoside	19.665	79,965		
		Myricetin-3-O-glucoside	21.814	31,333		
		Quercetin-3-O-galactoside	22.689	65,749		
		Quercetin-3-O-glucoside	23.466	162,693	23.165	17,380
		Siringetin-3-O-glucoside	26.790	71,502		
		Quercetin-7-O-neohesperidoside	28.236	160,861	28.013	4,425
		Quercetin aglycone	35.226	57,127	34.083	9,259
Chromatogram 520 nm	Anthocyanins	Delphinidin-3-O-glucoside			14.024	2,095
		Petunidin-3-O-glucoside	17.573	52,866	17.493	9,506
		Peonidin-3-O-glucoside	19.744	74,672	19.478	2,392
		Malvidin-3-O-glucoside	20.804	882,877	20.724	42,255
		Petunidin-3-O-(6'-acetyl)glucoside	26.547	34,547	26.743	1,275
		Peonidin-3-O-(6'-acetyl)glucoside	28.848	13,166		
		Malvidin-3-O-(6'-acetyl)glucoside	29.545	211,121	29.777	4,879
		Delphinidin-3-O-(6'-p-coumaroyl)glucoside	30.385	72,350	30.696	4,851
		Malvidin-3-O-(6'-caffeoyl)glucoside	32.285	192,783	32.599	3,931
		Cyanidin-3-O-(6'-p-coumaroyl)glucoside	32.677	28,817	32.893	1,373
		Petunidin-3-O-(6'-p-coumaroyl)glucoside	33.362	308,975	33.699	9,771
		Peonidin-3-O-(6'-p-coumaroyl)glucoside	35.785	195,123	36.016	5,279
		Malvidin-3-O-(6'-p-coumaroyl)glucoside	36.079	2,268,418	36.458	67,424

Rt, retention time.

temperatures over 100°C (64). Anthocyanins' chemical structure may have changed because of baking temperature by suffering cleavage, polymerization glycosylation, and/or nucleophilic attack of water (65).

To the best of our knowledge, this is the first study in which the phenolic compounds' loss during the baking of a biscuit with red grape pomace is evidenced by an advanced analytical method such as LC-MS.

4. Conclusion

Tannat grape pomace (TGP) microbiological and pesticide analyses showed values within food safety criteria, enabling the use of Uruguayan TGP as a food ingredient. Potential functional biscuits with the nutrition claims of “source of fiber” and “no-added sugar,” varying TGP (10–20% w/w in total wet dough), and sweetener sucralose (2–4% w/w in total wet dough) content were assessed by determining antioxidant, α -glucosidase, and pancreatic lipase inhibition capacities. The highest bioactive properties were exerted by TGP biscuits prepared with the highest substitution of sucralose (20 and 4% w/w total wet biscuit mass, respectively). Moreover, this TGP biscuit presented good sensory quality in a cluster of 37 out of 101 consumers. To the best of our knowledge, this is the first work that the phenolic compounds from TGP and TGP biscuits were identified by HPLC-DAD-MS showing degradation after baking with subsequent changes in phenolic profile. The main phenolic compounds found in TGP biscuit were malvidin-3-O-(6'-p-coumaroyl)glucoside, (+)-catechin, malvidin-3-O-glucoside, and (-)-epicatechin, which may be responsible for the exerted bioactive properties. In conclusion, the results of this study showed the potential of TGP biscuit as a functional food for the risk reduction of chronic diseases and with the concomitant reduction of environmental impact. The remaining phenolic compounds after baking may exert health-promoting properties on the consumers.

The current study is a preliminary study to state the adequate biscuit formulation for the addition of TGP by determining *in vitro* bioactive properties of TGP biscuits without compromising sensory quality. Moreover, this study provided information on the interaction between TGP phenolic compounds and food macro-components by the identification of the free phenolic compounds. In addition, the effect of food processing, especially baking, was also evidenced by the determination of phenolic compounds relative area which is of great importance when thinking about suitable food products for phenolic compounds' efficient health effects. Altogether, the present results show the suitability of TGP as a sustainable functional ingredient in the formulation of biscuits for controlling oxidative stress, glucose, and fatty acid levels.

Nevertheless, antioxidant capacity as well as inhibition of α -glucosidase and pancreatic lipase activities have been reported for changing after digestion (45), thus compromising their effect on human health. Hence, assessment of these properties after simulation of digestion should be addressed to state the remaining bioactive properties and phenolic compounds that may have health-promoting effects. Still, promising potential health benefits are to be expected as many phenolic compounds have been reported for remaining after *in vitro* simulation of digestion or changing

into other phenolic compounds that exert bioactive properties, such as proanthocyanidins and their derivatives (63). Moreover, the *in vitro* bioactivities determined in the present work are few of many mechanisms polyphenols may have on human health which are related to metabolic disorders such as diabetes and obesity. In addition, these bioactivities may not be exerted *in vivo*, thus clinical trials should be addressed to confirm the *in vitro* bioactivities determined in the present work.

Beyond determining what happens during digestion, further investigations on the bioactivity of TGP biscuits during the passage of time, as well as microbiological analyses, should be addressed to state their shelf life.

These additional investigations would contribute to a better understanding of the potential applications of grape pomace in food products and its impact on human health.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding authors.

Ethics statement

The studies involving humans were approved by Comité de Ética en Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Química, Universidad de la República, General Flores 2124, Montevideo 11800, Uruguay. The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. The participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

VO: data curation, formal analysis, investigation, validation, writing—original draft, and writing—review and editing. JB (microbiological analysis): data curation, formal analysis, investigation, and writing—review and editing. RC (HPLC-MS): data curation and investigation. EB (HPLC-MS): data curation. MA (sensory analysis): formal analysis. AG (sensory analysis): data curation, supervision, and writing—review and editing. SA (microbiological analysis): supervision and writing—review and editing. NGG (pesticide analysis): data curation, formal analysis, investigation, methodology, and writing—review and editing. MVC (pesticide analysis): supervision and writing—review and editing. HH (pesticide analysis): supervision and writing—review and editing. ED (HPLC-MS): data curation, methodology, supervision, and writing—review and editing. AMF-F: conceptualization, data curation, formal analysis, funding acquisition, investigation, methodology, project administration, resources, supervision, validation, writing—original draft, and writing—review and editing. AM: conceptualization, funding acquisition, project administration, resources, supervision,

validation, and writing—review and editing. All the authors have read and approved the submitted version.

Funding

This research was funded by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Project Grant Number: FMV_3_2020_1_162341 and VO scholarship POS_NAC_M_2020_1_164532; and VO student scholarship from Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA).

Acknowledgments

The authors would like to thank the Bouza wine cellar (Montevideo, Uruguay) for providing Tannat grape pomace.

References

- Gómez-García R, Campos DA, Aguilar CN, Madureira AR, Pintado M. Valorisation of food agro-industrial by-products: from the past to the present and perspectives. *J Environ Manage.* (2021) 299:113571. doi: 10.1016/j.jenvman.2021.113571
- Rodríguez RP, Gando-Ferreira LM, Quina MJ. Increasing value of winery residues through integrated biorefinery processes: a review. *Molecules.* (2022) 27:154709. doi: 10.3390/molecules27154709
- Ferrer-Gallego R, Silva P. The wine industry by-products: applications for food industry and health benefits. *Antioxidants.* (2022) 11:2025. doi: 10.3390/antiox11102025
- INAVI. *Estadísticas de viñedos 2022 Datos nacionales.* (2022). Available online at: <https://www.inavi.com.uy/vinedos/estadisticas/Retrieved> (accessed June 08, 2023).
- Boido E, García-Marino M, Dellacassa E, Carrau F, Rivas-Gonzalo JC, Escribano-Bailón MT. Characterisation and evolution of grape polyphenol profiles of *Vitis vinifera* L. cv Tannat during ripening and vinification. *Austral J Grape Wine Res.* (2011) 17:383–93. doi: 10.1111/j.1755-0238.2011.00164.x
- Boido E, Fariña L, Carrau F, Cozzolino D, Dellacassa E. Application of near-infrared spectroscopy/artificial neural network to quantify glycosylated norisoprenoids in Tannat grapes. *Food Chem.* (2022) 387:132927. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.132927
- Brunetti L, Leuci R, Colonna MA, Carrieri R, Celentano FE, Bozzo G, et al. Food industry byproducts as starting material for innovative, green feed formulation: a sustainable alternative for poultry feeding. *Molecules.* (2022) 27:4735. doi: 10.3390/molecules27154735
- Martins IM, Macedo GA, Macedo JA. Biotransformed grape pomace as a potential source of anti-inflammatory polyphenolics: effects in Caco-2 cells. *Food Biosci.* (2020) 35:100607. doi: 10.1016/j.foodsci.2020.100607
- Temkov M, Velickova E, Stamatovska V, Nakov G. Consumer perception on food waste management and incorporation of grape pomace powder in cookies. *J Agri Rural Dev.* (2021) 21:753–62. Available online at: https://managementjournal.usamv.ro/pdf/vol.21_1/Art86.pdf
- Chiavaroli A, Balaha M, Acquaviva A, Ferrante C, Cataldi A, Menghini L, et al. Phenolic characterization and neuroprotective properties of grape pomace extracts. *Molecules.* (2021) 26:206216. doi: 10.3390/molecules26206216
- Fernández-Fernández AM, Iriondo-DeHond A, Dellacassa E, Medrano-Fernandez A, del Castillo MD. Assessment of antioxidant, antidiabetic, antiobesity, and anti-inflammatory properties of a Tannat winemaking by-product. *Eur Food Res Technol.* (2019) 245:1539–51. doi: 10.1007/s00217-019-03252-w
- Mhlongo G, Mnisi CM, Mlambo V. Cultivating oyster mushrooms on red grape pomace waste enhances potential nutritional value of the spent substrate for ruminants. *PLoS ONE.* (2021) 16:1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0246992
- Fernández-Fernández AM, Dellacassa E, Nardin T, Larcher R, Ibañez C, Terán D, et al. Tannat grape skin: a feasible ingredient for the formulation of snacks with potential for reducing the risk of diabetes. *Nutrients.* (2022) 14:30419. doi: 10.3390/nu14030419
- Frum A, Dobrea CM, Rus LL, Virchea L, Morgovan C, Chis AA, et al. Valorization of grape pomace and berries as a new and sustainable dietary supplement:

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

development, characterization, and antioxidant activity testing. *Nutrients.* (2022) 14:3065. doi: 10.3390/nu14153065

15. Antonic B, Jančiková S, Dordević D, Tremlová B. Grape pomace valorization: a systematic review and meta-analysis. *Foods.* (2020) 9:1627. doi: 10.3390/foods9111627

16. Salanță LC, Uifălean A, Iuga CA, Tofană M, Cropotova J, Lelia Pop O, et al. Valuable food molecules with potential benefits for human health. *Health Benefits Foods.* (2020) 2020:91218. doi: 10.5772/intechopen.91218

17. Pinto D, Moreira MM, Švarc-Gajić J, Vallverdú-Queralt A, Brezo-Borjan T, Delerue-Matos C, et al. In-vitro gastrointestinal digestion of functional cookies enriched with chestnut shells extract: effects on phenolic composition, bioaccessibility, bioactivity, and α -amylase inhibition. *Food Biosci.* (2023) 53:102766. doi: 10.1016/j.foodsci.2023.102766

18. Urquiga I, Troncoso D, Mackenna MJ, Urzúa C, Pérez D, Dicenta S, et al. The consumption of beef burgers prepared with wine grape pomace flour improves fasting glucose, plasma antioxidant levels, and oxidative damage markers in humans: a controlled trial. *Nutrients.* (2018) 10:101388. doi: 10.3390/nu10101388

19. AOAC. *Official Methods of Analysis.* 16th ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists (1999).

20. Ministerio de Salud Pública. *Reglamento Bromatológico Nacional.* IMPO. (2012). Available online at: <https://www.impo.com.uy/bases/decretos-reglamento/315-1994Reglamento Bromatológico Nacional> (accessed June 08, 2023).

21. Fernandez DA. *Aprovechamiento de orujo de uva borgoña negra (vitis labrusca) en bolsa filtrante.* Repositorio - UNSM. (2013). Available online at: <http://repositorio.unsm.edu.pe/handle/11458/561> (accessed June 02, 2023).

22. Feng P, Weagant S, Grant M, Burkhardt W. *Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria.* FDA. Chapter 4 in Bacteriological Analytical Manual (BAM). (2020). Available online at: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria> (accessed June 02, 2023).

23. Tournas V, Stack ME, Mislivec PB, Koch HA, Bandler R. *Yeasts, Molds and Mycotoxins.* FDA. Chapter 18 in Bacteriological Analytical Manual (BAM). (2001). Available online at: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-18-yeasts-molds-and-mycotoxins> (accessed June 08, 2023).

24. Pihlström T, Fernández-Alba A, Ferrer Amate C, Erecius Poulsen M, Hardebusch B, Anastassiades M. *Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed.* Document N° SANTE/11312/2021. (2021). Available online at: <https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl/article.asp?CntID=727> (accessed February 15, 2023).

25. ISO 8589. *Sensory Analysis: General Guidance for the Design of Test Rooms.* Geneva: International Organization for Standardization (2007). Available online at: <https://www.iso.org/standard/36385.html>

26. Jaeger SR, Beresford MK, Paisley AG, Antúnez L, Vidal L, Cadena RS, et al. Check-all-that-apply (CATA) questions for sensory product characterization by consumers: Investigations into the number of terms used in CATA questions. *Food Qual Prefer.* (2015) 42:154–64. doi: 10.1016/j.foodqual.2015.02.003

27. Peña-Vázquez GI, Domínguez-Fernández MT, Camacho-Zamora BD, Hernandez-Salazar M, Urias-Orona V, De Peña MP, et al. *In vitro*

- simulated gastrointestinal digestion impacts bioaccessibility and bioactivity of Sweet orange (*Citrus sinensis*) phenolic compounds. *J Funct Foods*. (2022) 88:104891. doi: 10.1016/j.jff.2021.104891
28. Olt V, Báez J, Curbelo R, Boido E, Dellacasa E, Fernández-Fernández AM, et al. Development of potential functional biscuits with the incorporation of tannat grape pomace and sweetener. *Biol Life Sci For*. (2022) 18:50. doi: 10.3390/Foods2022-13067
29. Curbelo R, Davyt D, Nardin T, Larcher R, Carrau F, Coniberti A, et al. Dinámica biosintética de polifenoles galoileados en la maduración de uvas Tannat: importancia enológica y valor como componentes funcionales en el vino. In: *43rd World Congress of Vine and Wine and the 20th General Assembly of the International Organisation of Vine and Wine (OIV)*. Baja California, Mexico (2022).
30. Zhu F, Du B, Zheng L, Li J. Advance on the bioactivity and potential applications of dietary fibre from grape pomace. *Food Chem*. (2015) 186:207–12. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.07.057
31. AOAC. *Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate. Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry First Action 2007*. AOAC International. (2007). Available online at: https://nucleus.iaea.org/sites/fcris/Shared-Documents/SOP/AOAC_2007_01.pdf
32. Rainero G, Bianchi F, Rizzi C, Cervini M, Giuberti G, Simonato B. Breadstick fortification with red grape pomace: effect on nutritional, technological and sensory properties. *J Sci Food Agric*. (2022) 102:2545–52. doi: 10.1002/jsfa.11596
33. Kuchtová V, Kohajdová Z, Karovičová J, Lauková M. Physical, textural and sensory properties of cookies incorporated with grape skin and seed preparations. *Pol J Food Nutr Sci*. (2018) 68:309–17. doi: 10.2478/pjfn-2018-0004
34. Muñoz AM. Sensory evaluation in quality control: an overview, new developments and future opportunities. *Food Qual Prefer*. (2002) 13:329–39. doi: 10.1016/S0950-3293(02)00014-9
35. Theagarajan R, Malur Narayanaswamy L, Dutta S, Moses JA, Chinnaswamy A. Valorisation of grape pomace (cv. Muscat) for development of functional cookies. *Int J Food Sci Technol*. (2019) 54:1299–305. doi: 10.1111/ijfs.14119
36. Nakov G, Brandolini A, Hidalgo A, Ivanova N, Stamatovska V, Dimov I. Effect of grape pomace powder addition on chemical, nutritional and technological properties of cakes. *LWT*. (2020) 134:109950. doi: 10.1016/j.lwt.2020.109950
37. Dwibedi V, Jain S, Singhal D, Mittal A, Rath SK, Saxena S. Inhibitory activities of grape bioactive compounds against enzymes linked with human diseases. *Appl Microbiol Biotechnol*. (2022) 106:1399–417. doi: 10.1007/s00253-022-11801-9
38. Akkarachiyasit S, Charoenlertkul P, Yibchok-Anun S, Adisakwattana S. Inhibitory activities of cyanidin and its glycosides and synergistic effect with acarbose against intestinal α -glucosidase and pancreatic α -amylase. *Int J Mol Sci*. (2010) 11:3387–96. doi: 10.3390/ijms11093387
39. Wang S, Dong S, Zhang R, Shao H, Liu Y. Effects of proanthocyanidins on porcine pancreatic lipase: conformation, activity, kinetics and thermodynamics. *Process Biochem*. (2014) 49:237–43. doi: 10.1016/j.procbio.2013.10.018
40. Boath AS, Grussu D, Stewart D, McDougall GJ. Berry polyphenols inhibit digestive enzymes: a source of potential health benefits? *Food Dig*. (2012) 3:1–7. doi: 10.1007/s13228-012-0022-0
41. Boath AS, Stewart D, McDougall GJ. Berry components inhibit α -glucosidase *in vitro*: synergies between acarbose and polyphenols from black currant and rowanberry. *Food Chem*. (2012) 135:929–36. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.06.065
42. Ostberg-Potthoff JJ, Berger K, Richling E, Winterhalter P. Activity-guided fractionation of red fruit extracts for the identification of compounds influencing glucose metabolism. *Nutrients*. (2019) 11:1166. doi: 10.3390/nu11051166
43. Gironés-Vilaplana A, Villaño D, Moreno DA, García-Viguera C. New isotonic drinks with antioxidant and biological capacities from berries (maqui, açai and blackthorn) and lemon juice. *Int J Food Sci Nutr*. (2013) 64:897–906. doi: 10.3109/09637486.2013.809406
44. Li K, Yao F, Du J, Deng X, Li C. Persimmon tannin decreased the glycemic response through decreasing the digestibility of starch and inhibiting α -amylase, α -glucosidase, and intestinal glucose uptake. *J Agric Food Chem*. (2018) 66:1629–37. doi: 10.1021/acs.jafc.7b05833
45. Thomas-Valdés S, Theoduloz C, Jiménez-Aspee F, Schmeda-Hirschmann G. Effect of simulated gastrointestinal digestion on polyphenols and bioactivity of the native Chilean red strawberry (*Fragaria chiloensis* ssp. *chiloensis* f. *patagonica*). *Food Res Int*. (2019) 123:39. doi: 10.1016/j.foodres.2019.04.039
46. Zhang B, Deng Z, Ramdath DD, Tang Y, Chen PX, Liu R, et al. Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on α -glucosidase and pancreatic lipase. *Food Chem*. (2015) 172:862–72. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.09.144
47. Bastías-Montes JM, Monterrosa K, Muñoz-Fariña O, García O, Acuña-Nelson SM, Vidal-San Martín C, et al. Chemoprotective and antiobesity effects of tocotols from seed oil of Maqui-berry: their antioxidative and digestive enzyme inhibition potential. *Food Chemical Toxicol*. (2020) 136:111036. doi: 10.1016/j.fct.2019.111036
48. Lachowicz S, Wiśniewski R, Ochmian I, Drzymała K, Pluta S. Anti-microbiological, anti-hyperglycemic and anti-obesity potency of natural antioxidants in fruit fractions of saskatoon berry. *Antioxidants*. (2019) 8:90397. doi: 10.3390/antiox8090397
49. Kato-Schwartz CG, Corrêa RCG, de Souza Lima D, de Sá-Nakanishi AB, de Almeida Gonçalves G, Seixas FAV, et al. Potential anti-diabetic properties of Merlot grape pomace extract: an *in vitro*, *in silico* and *in vivo* study of α -amylase and α -glucosidase inhibition. *Food Res Int*. (2020) 137:109462. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109462
50. Dudoit A, Benbouguerra N, Richard T, Hornedo-Ortega R, Valls-Onayet J, Coussot G, et al. α -glucosidase inhibitory activity of tannat grape phenolic extracts in relation to their ripening stages. *Biomolecules*. (2020) 10:1–18. doi: 10.3390/biom10081088
51. Iriondo-DeHond M, Blázquez-Duff JM, del Castillo MD, Miguel E. Nutritional quality, sensory analysis and shelf life stability of yogurts containing inulin-type fructans and winery byproducts for sustainable health. *Foods*. (2020) 9:1199. doi: 10.3390/foods9091199
52. Lavelli V, Sri Harsha PSC, Ferranti P, Scarafoni A, Iametti S. Grape skin phenolics as inhibitors of mammalian α -glucosidase and α -amylase—effect of food matrix and processing on efficacy. *Food Funct*. (2016) 7:1655–63. doi: 10.1039/C6FO00073H
53. Jakobek L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chem*. (2015) 175:556–67. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.12.013
54. Díez-Sánchez E, Quiles A, Llorca E, Reißner AM, Struck S, Rohm H, et al. Extruded flour as techno-functional ingredient in muffins with berry pomace. *LWT*. (2019) 113:108300. doi: 10.1016/j.lwt.2019.108300
55. Lachowicz S, Swieca M, Pejcz E. Improvement of health-promoting functionality of rye bread by fortification with free and microencapsulated powders from amelanchier *almifolia* nutt. *Antioxidants*. (2020) 9:1–24. doi: 10.3390/antiox9070614
56. Carullo G, Spizzirri UG, Loizzo MR, Leporini M, Sicari V, Aiello F, et al. Valorization of red grape (*Vitis vinifera* cv. Sangiovese) pomace as functional food ingredient. *Ital J Food Sci*. (2020) 32:367–85. doi: 10.14674/IJFS-1758
57. Tormási J, Abrankó L. Impact of grape seed powder and black tea brew on lipid digestion—an *in vitro* co-digestion study with real foods. *Nutrients*. (2023) 15:2395. doi: 10.3390/nu15102395
58. Martínez-Saez N, Hochkoglger CM, Somoza V, del Castillo MD. Biscuits with no added sugar containing stevia, coffee fibre and fructooligosaccharides modifies α -glucosidase activity and the release of GLP-1 from HuTu-80 cells and serotonin from Caco-2 cells after *in vitro* digestion. *Nutrients*. (2017) 9:1–15. doi: 10.3390/nu9070694
59. Fernández-Fernández AM, Dellacasa E, Nardin T, Larcher R, Gámbaro A, Medrano-Fernandez A, et al. *In vitro* bioaccessibility of bioactive compounds from citrus pomaces and orange pomace biscuits. *Molecules*. (2021) 26:3480. doi: 10.3390/molecules26123480
60. Fernandes ACF, Martins IM, Moreira DKT, Macedo GA. Use of agro-industrial residues as potent antioxidant, antiglycation agents, and α -amylase and pancreatic lipase inhibitory activity. *J Food Process Preserv*. (2020) 44:1–12. doi: 10.1111/jfpp.14397
61. Favre G, Hermosín-Gutiérrez I, Piccardo D, Gómez-Alonso S, González-Neves G. Selectivity of pigments extraction from grapes and their partial retention in the pomace during red-winemaking. *Food Chem*. (2019) 277:391–7. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.10.055
62. Kaur M, Singh V, Kaur R. Effect of partial replacement of wheat flour with varying levels of flaxseed flour on physicochemical, antioxidant and sensory characteristics of cookies. *Bioact Carbohydr Diet Fibre*. (2017) 9:14–20. doi: 10.1016/j.bcdf.2016.12.002
63. Unusan N. Proanthocyanidins in grape seeds: an updated review of their health benefits and potential uses in the food industry. *J Funct Foods*. (2020) 67:103861. doi: 10.1016/j.jff.2020.103861
64. Yu J, Ahmedna M. Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *Int J Food Sci Technol*. (2013) 48:221–37. doi: 10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x
65. Tena N, Asuero AG. Antioxidant capacity of anthocyanins and other vegetal pigments. *Antioxidants*. (2020) 9:1–3. doi: 10.3390/antiox9080665