



**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y
FUNCIONAL DE LOS EXTRACTOS DE
HOJAS DE MANGO, OLIVO Y HOLLEJO DE
UVA TINTA OBTENIDOS A PARTIR DE
EXTRACCIÓN CON LÍQUIDOS
PRESURIZADOS Y SUS APLICACIONES EN
EL CAMPO DE LA BIOMEDICINA**

Facultad de ciencias
Departamento de biomedicina, biotecnología y salud pública
TFG: Grado en Biotecnología

Tutor 1: M^a Carmen Durán Ruiz
Tutor 2: Ismael Sánchez Gomar
Autora: Josefa Benítez Camacho
Curso 2019/2020



AGRADECIMIENTOS

No ha sido nada fácil conseguir terminar este trabajo, no solo por enfrentarnos cada día a nuevos problemas en un laboratorio, sino por la extraña situación con la que todos nos hemos encontrado, tener que lidiar con la incertidumbre de estos tiempos tan dolorosos y a la vez el gran trabajo y esfuerzo que quedaba por delante.

Primeramente, quiero agradecer a mis Tutores M^a Carmen e Ismael por ayudarme en todo momento, por aconsejarme y guiarme sacando siempre un hueco por muy poco tiempo que tengan. Agradecer a todo el equipo de Casimiro, especialmente a Teresa, por su paciencia, dedicación y gran apoyo. Gracias a Lourdes, a Cristina y Casimiro por ayudarme cada vez que lo he necesitado y gracias a todos por darme la oportunidad de realizar este trabajo.

Muchas gracias a mis compañeros de laboratorio – Paula, Isa, José – pero sobre todo a mi compañero y buen amigo Jorge por soportar todas mis meteduras de pata, por ayudarme a ser más ordenada, por las risas, por las conversaciones, por los buenos ratos y por haber estado siempre ahí.

También quiero agradecerles a mis compañeros de clase por haber hecho que estos cuatro años hayan sido tan especiales, a mis amigos por animarme siempre, y sobre todo a Fran por todas las videollamadas, por todo el apoyo y aportarme tanta felicidad.

Y, por último, pero no menos importante quiero agradecerles a las personas que más me han ayudado no solo en estos meses sino en toda mi vida, a mi familia, a mis padres, a mi hermana, por creer siempre en mí, por hacerme ver siempre el lado positivo de las cosas, por el cariño y por ser mi gran apoyo.

Índice

1.	LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
2.	PROPUESTA DEL TFG ASIGNADO	3
3.	RESUMEN	4
4.	ABSTRACT.....	5
5.	INTRODUCCIÓN	6
5.1.	Revalorización de los desechos de la industria agroalimentaria.....	6
5.2.	Técnicas de extracción a alta presión.....	6
5.2.1.	Extracción con líquidos presurizados.....	7
5.3.	Polifenoles en los subproductos de la industria agroalimentaria	8
5.3.1	Metabolitos con actividades biológicas en las hojas de mango.....	8
5.3.2	Metabolitos con actividades biológicas en las hojas de olivo	9
5.3.3	Metabolitos con actividades biológicas en el hollejo de uva tinta	10
5.4.	Aplicación biomédica de los extractos y estrés oxidativo	11
5.4.1.	Enfermedades cardiacas y aterosclerosis	11
5.4.2.	Cáncer	12
5.4.3.	Enfermedades neurodegenerativas	13
5.4.4.	Enfermedades autoinmunes e inflamatorias	13
6.	OBJETIVOS	14
7.	SOLUCIÓN TÉCNICA.....	15
7.1.	MATERIALES Y MÉTODOS	15
7.1.1.	Materias primas y reactivos	15
7.1.2.	Equipos de extracción a alta presión	16
7.1.3.	Otros equipos:	17
7.1.4.	Metodología de extracción con líquidos presurizados:	17
7.1.5.	Rendimiento de la extracción	18
7.1.6.	Caracterización química de los extractos.....	19
7.1.6.1.	Análisis del contenido en polifenoles totales (TPC)	19
7.1.6.2.	Análisis del contenido total en antocianos	20
7.1.7.	Caracterización funcional de los extractos	21
7.1.7.1.	Análisis de la actividad antioxidante	21
7.1.8.	Análisis estadísticos	24
7.1.9.	Búsqueda bibliográfica de las aplicaciones biomédicas de los extractos	24
7.2.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25

7.2.1. Extracción con líquidos presurizados (PLE)	25
7.2.2. Rendimiento global	26
7.2.3. Caracterización química de los extractos	28
7.2.3.1. Contenido en polifenoles totales	28
7.2.3.2. Contenido en antocianos (TAC)	31
7.2.4. Caracterización funcional de los extractos	31
7.2.4.1. Capacidad antioxidante	31
7.2.5. Aplicaciones biomédicas	35
7.2.5.1. Enfermedades cardíacas y aterosclerosis	35
8. CONCLUSIONES	38
9. PERSPECTIVAS DE FUTURO	39
10. BIBLIOGRAFÍA	40

1. LISTA DE ABREVIATURAS

AAI	Índice de actividad antioxidante
AG	Ácido gálico
AGE	Ácido gálico equivalente
AM	Antocianina monomérica
AME	Antocianina monomérica equivalente
ANOVA	Análisis de la varianza
ATP	Adenosín trifosfato
Api7G	Apigenina 7-glucósido
BPR	Válvula reguladora de presión
CAT	Catalasa
C/EBP	Proteína CCAAT- potenciador de unión
CHOP	Proteína homóloga de unión al potenciador CCAAT
CSIC	Consejo Nacional de Investigación de España
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo
EC ₅₀	Concentración efectiva media máxima
ECFCs	Células formadoras de colonias endoteliales de crecimiento tardío
ER	Estrés del retículo endoplasmático
FCCP	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
GRP78	Proteína reguladora de glucosa de 78 KDa
HDL	Lipoproteínas de alta densidad

hHSC	Células madre hematopoyéticas humanas
HUVEC	Células endoteliales de cordón umbilical humano
IHSM	Instituto para la Horticultura Mediterránea y Subtropical
LDL	Lipoproteína de baja densidad
Lut7G	Luteolina 7-glucósido
NO	Óxido nítrico
OxLDL	LDL oxidado
PLE	Extracción con fluidos presurizados
ppm	Partes por millón
RCT	Transporte de colesterol reverso
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SCD	Superóxido dismutasa
SFE	Extracción con fluidos supercríticos
SWE	Extracción con agua subcrítica
TBARS	Sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico
TAC	Contenido en antocianos totales
TFG	Trabajo de fin de grado
TPC	Contenido en polifenoles totales
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

2. PROPUESTA DEL TFG ASIGNADO

Título: Caracterización química y funcional de los extractos de hojas de mango, olivo y hollejo de uva tinta obtenidos a partir de extracción con líquidos presurizados y sus aplicaciones en el campo de la biomedicina.

Carácter: Trabajo investigación en laboratorio con ampliación bibliográfica

Descripción:

La industria agroalimentaria genera grandes cantidades anuales de residuos agrícolas. La valorización de estos residuos tiene gran utilidad en diversos campos, como en la farmacia, la cosmética o la alimentación. Los compuestos bioactivos contenidos en las hojas de mango (*Mangifera Indica*), en las hojas de olivo (*Olea europaea*), y en el hollejo de uva tinta (*Vitis vinifera*) pueden ser obtenidos a partir de extracción con líquidos presurizados, una alternativa a las tecnologías tradicionales de gran interés en la biotecnología, ya que incrementa el rendimiento y la selectividad del proceso, con cortos tiempos de extracción y es muy respetuoso con el medio ambiente, factor que adquiere cada vez mayor importancia en todo tipo de industrias químicas y biotecnológicas. Por otro lado, existe un gran interés biotecnológico, sobre todo en el campo de la biomedicina, por explotar el potencial de los compuestos bioactivos (antocianinas, polifenoles...), especialmente su poder antioxidante. El estrés oxidativo se produce por la acción de radicales libres que se encuentran de forma natural en nuestro organismo o incentivadas por factores externos, y que se encuentran en equilibrio con otros compuestos antioxidantes. El desequilibrio a favor de los radicales libres desemboca en enfermedades inflamatorias, autoinmunes, cardiovasculares o neurodegenerativas, de tal modo que los compuestos bioactivos contenidos en los extractos naturales constituyen una alternativa sostenible y natural para paliarlas. En este TFG, se va a realizar un trabajo experimental centrado en la extracción de los compuestos bioactivos antes mencionados, así como en la evaluación de la influencia del uso de diferentes disolventes (agua y etanol) en la composición química y poder antioxidante de los extractos de hojas de mango y olivo y hollejo de uva tinta. Este trabajo se completará con una búsqueda bibliográfica con objeto de evaluar las distintas aplicaciones biomédicas de dichos extractos. Así, la alumna adquirirá todas las competencias básicas, específicas y transversales que se contemplan en la memoria del Grado en Biotecnología.

3. RESUMEN

Los residuos agroalimentarios constituyen una fuente de sustancias con un gran potencial de aplicación en diversos campos de la biotecnología. La revalorización de las hojas de mango, hojas de olivo y hollejo de uva tinta puede llevarse a cabo a través de la utilización de los extractos procedentes de estos recursos naturales en la industria alimentaria, farmacéutica o cosmética. Sin embargo, cabe destacar que el potencial antioxidante de estos extractos está siendo de gran utilidad en la investigación sobre enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

Este trabajo de fin de grado pretende analizar las propiedades químicas y biológicas de los extractos procedentes de las tres materias primas anteriormente citadas, obtenidos por la técnica de extracción con fluidos presurizados (PLE) en unas condiciones de 80°C y 200 bar, utilizando como disolventes agua o etanol.

La caracterización química consiste en evaluar el contenido total en polifenoles (TPC) y, exclusivamente para los extractos de hollejo de uva tinta, el contenido en antocianos totales (TAC), mientras que la caracterización funcional consiste en determinar la capacidad antioxidante de dichos extractos, encontrándose en los extractos etanólicos un mayor poder antioxidante.

Todo lo anterior se completa con una revisión bibliográfica sobre el potencial biomédico de los diferentes extractos, sobre todo en el campo de las enfermedades cardiovasculares, determinándose dicho potencial no solo se debe a la capacidad antioxidante, sino que también se encuentra relacionado con otras muchas capacidades, como la regulación de la presión, de la función endotelial, del metabolismo lipídico, de la función plaquetaria y de los niveles de colesterol, así como el restablecimiento de la actividad mitocondrial.

4. ABSTRACT

Agro-food waste constitutes a source of substances with great potential for application in various fields of biotechnology. The revaluation of mango leaves, olive leaves and red grape skin can be carried out using extracts from these natural resources in the food, pharmaceutical or cosmetic industry. However, it should be noted that the antioxidant potential of these extracts is being very useful in research on diseases related to oxidative stress.

This final degree project aims to analyze the chemical and biological properties of extracts from the three raw materials mentioned above, obtained by the extraction technique with pressurized fluids (PLE) under conditions of 80°C and 200 bar, using water or ethanol as solvents.

The chemical characterization consists of evaluating the total content of polyphenols (TPC) and, exclusively for the extracts of red grape skin, the content of total anthocyanins (TAC), while the functional characterization consists of determining the antioxidant capacity of said extracts, finding in the ethanolic extracts a greater antioxidant power.

Moreover, this work is completed with a bibliographic review on the biomedical potential of the different extracts, especially in the field of cardiovascular diseases, determining that these are not only due to the antioxidant capacity, but to many other capacities, such as the regulation of pressure, endothelial function, lipid metabolism, platelet function and cholesterol levels, as well as the restoration of mitochondrial activity.

5. INTRODUCCIÓN

5.1. Revalorización de los desechos de la industria agroalimentaria

Numerosos materiales de origen vegetal son descartados en la industria a pesar de ser ricos en aceites esenciales y polifenoles. El estudio de los extractos obtenidos a partir de fuentes naturales tales como plantas, especies, semillas, hojas, raíces o tallos proporciona un valor añadido a estos residuos (Cejudo Bastante et al., 2017).

Así, el cultivo del mango (*Mangifera indica L.*), la tercera fruta tropical más popular del mundo, produce unas considerables cantidades anuales de desechos agroindustriales, constituidos por la piel, las semillas, las hojas y la corteza del tallo. Cabe destacar el papel de las hojas de mango como una importante fuente de polifenoles con importantes aplicaciones farmacéuticas debidas a su capacidad antioxidante (Sanchez-Sanchez et al., 2017). Del mismo modo, las hojas de olivo (*Olea europaea L.*), generan el 10% de los subproductos generados en la almazara. Sin embargo, numerosos estudios han revelado las importantes propiedades biológicas de polifenoles que contienen, destacando el papel del metabolito secundario oleuropeína (Xynos et al., 2012). Por otro lado, existe una nueva perspectiva en la industria vinífera interesada en el aprovechamiento de los desechos generados, ya que, tras la fermentación alcohólica, el 25% de la uva procesada forma un residuo sólido orgánico denominado hollejo. La gran cantidad de hollejo producida anualmente es utilizada como pienso animal o como fertilizante orgánico, sin embargo, algunos estudios afirman que el 70% de los polifenoles de las uvas permanecen en el hollejo, de forma que sus propiedades antioxidantes pueden ser explotadas (Brezoiu et al., 2019).

5.2. Técnicas de extracción a alta presión

Las técnicas convencionales de extracción tales como la decocción y la maceración, utilizados en la farmacognosia de forma tradicional, están siendo desplazadas por nuevas técnicas emergentes como la extracción asistida por ultrasonido, la extracción con fluidos supercríticos (SFE) y la extracción con líquidos presurizados (PLE), que son mucho más eficientes. Las dos últimas son especialmente llamativas debido a la alta eficacia, a que son técnicas respetuosas con el medio ambiente, el ahorro de energía y tiempo y el uso de disolventes “verdes”, si bien el inconveniente de las altas temperaturas y presiones es fácilmente solventado mediante sistemas de seguridad eficientes (Fernández-Ponce et al., 2017).

La extracción con fluidos supercríticos, cuyo principal disolvente es CO₂ supercrítico, es el método más adecuado para aislar compuestos apolares lipofílicos, dada su alta selectividad, rapidez, automaticidad y seguridad ambiental, sin embargo, requiere altas cantidades de co-disolvente (metanol, etanol o agua principalmente), para extraer compuestos polares (Xynos et al., 2012), como es el caso de los polifenoles contenidos en los materiales que nos incumben. Por

ello, la extracción con líquidos a alta presión, usando agua o etanol como disolventes podrían constituir una óptima alternativa para dicho propósito (Fernández-Ponce et al., 2017).

5.2.1. Extracción con líquidos presurizados

La extracción con líquidos presurizados (PLE) involucra el uso de disolventes líquidos a altas temperatura y presión por debajo de su punto crítico, de manera que, aunque la temperatura sea superior al punto de ebullición, el disolvente permanecerá líquido gracias a la alta presión. De esta manera se mejora el rendimiento de la extracción, al mejorar la solubilidad y favorecer la transferencia de masa (Hurtado, 2018).

Al igual que otras técnicas de alta presión, la PLE resulta efectiva en extractos con mayor actividad biológica frente a los obtenidos en extracciones convencionales, dado que se potencia la transferencia de masa debido al aumento de la permeabilidad celular y la difusión de los metabolitos secundarios, además, se evita la degradación de los compuestos activos mediante la ausencia de luz y oxígeno, cuando se trabaja a temperaturas moderadas (Fernández-Ponce et al., 2017).

Los parámetros más influyentes en la técnica PLE son la presión, temperatura, tiempo de extracción y el disolvente empleado. Un aumento de la temperatura resulta en un incremento de la transferencia de masa, mejorando la solubilidad en el caso de que el disolvente sea agua; sin embargo, un aumento excesivo de la temperatura puede acarrear un contenido fenólico menor debido a la degradación de los compuestos termolábiles, como es el caso de algunos extractos etanólicos donde la temperatura es cercana a los 100 °C. Así, se determinó que el rango óptimo de temperatura es 60-100 °C. En cuanto a la presión, su incremento se relaciona con una reducción de la tensión superficial del disolvente favoreciendo el contacto disolvente-analito, generalmente se observa un efecto favorecedor cuando se aumenta hasta 200 bares. Todos estos parámetros han sido experimentalmente optimizados (Fernández-Ponce et al., 2015).

Los disolventes más comúnmente usados son agua, metanol, acetona y hexano. Cuando el disolvente usado es agua, la técnica se denomina extracción con agua subcrítica (SWE) donde las altas condiciones de presión mejoran la solubilidad de compuestos hidrofílicos (Oreopoulou et al., 2019). Sin embargo, los polifenoles pueden tener diferentes polaridades debido a la presencia de grupos hidroxilos, así, la literatura muestra como en muchas ocasiones la extracción de estos compuestos es más eficaz cuando se usan disolventes etanólicos o mezclas hidroalcohólicas, aumentando la polaridad del disolvente (Messina et al., 2019). La importancia del disolvente radica no solo en la composición final del extracto, sino también en sus propiedades biológicas. De esta manera, se observa que los extractos acuosos de hojas de mango tienen propiedades gastroprotectoras, mientras que en el caso de los extractos etanólicos, tienen actividades hipolipidémicas y hepatoprotectoras (Fernández-Ponce et al., 2017).

5.3. Polifenoles en los subproductos de la industria agroalimentaria

Los polifenoles constituyen un amplio grupo de compuestos bioactivos que puede subdividirse en varios grupos, entre los que destacan los flavonoides, estilbenos, ácidos fenólicos y los lignanos. Si bien muchos de los efectos beneficiosos de los polifenoles están relacionados con su propiedades antioxidantes, se han identificado otros muchos mecanismos como su capacidad de ejercer diferentes efectos en rutas de señalización extra e intracelulares, tales como la regulación de factores de transcripción nucleares, interfiriendo en el metabolismo de las grasas, o en la regulación de la síntesis de moduladores de la inflamación (Fraga et al., 2019). En los siguientes apartados se describirán los polifenoles presentes en las tres materias primas que se han seleccionado en el presente estudio.

5.3.1 Metabolitos con actividades biológicas en las hojas de mango

La producción de mango es de aproximadamente 42 millones de toneladas por año existiendo unas 1000 variedades. Tanto la piel como la parte carnosa son ricas en fibra, vitaminas C y A y aminoácidos esenciales, mientras que las semillas y hojas (figura 1A) son ricas en polifenoles. El uso de las distintas partes de esta planta en etno-medicina es bien conocido, y por ello se estudian los distintos compuestos biológicamente activos presentes (Ediriweera et al., 2017).

Entre todos los compuestos polifenólicos contenidos en el mango, cabe destacar el papel de la mangiferina (C-2- β -D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetrahidroxixantona o C-glucosil xantona) (figura 1B). Se trata de una molécula farmacológicamente activa con actividad antioxidante, antiinflamatoria, antidiabética, inmunomoduladora y antitumoral. Es capaz de promover la migración de las células endoteliales durante la angiogénesis, resultando prometedor su uso en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Luo et al., 2012).

Las propiedades de otros compuestos, como ácido gálico, ácido ferúlico, epicatequina, galotaninos, flavonoides o benzofenonas entre otros están siendo también estudiadas, presentando propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antiobesogénicas, reguladoras del colesterol y antidiabéticas. Estos compuestos, al igual que la mangiferina, se encuentran ampliamente en las hojas del mango (Gu et al., 2019).

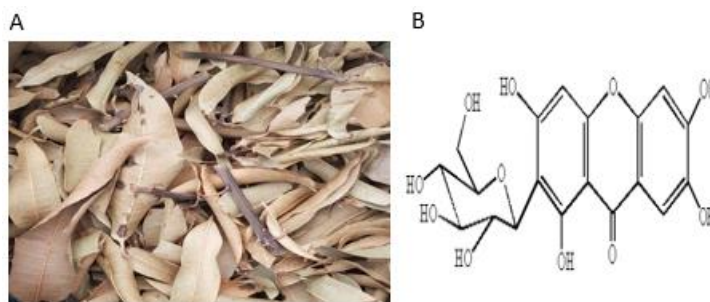


Figura 1: Hojas de mango (*Mangifera indica* L.) como materia prima de la extracción PLE. A) Hojas de mango empleadas en la extracción B): Estructura de la mangiferina, principal polifenol de las hojas de mango (Luo et al., 2012).

Aunque los métodos tradicionales de extracción han sido ampliamente empleados en la obtención de extractos a partir de mango, como la maceración, la extracción por soxhlet y la extracción por reflujo, éstos requieren tiempos de extracción muy largos, con el consiguiente riesgo de degradación de los compuestos termolábiles, como los polifenoles que contiene (Acosta Esquijorosa et al., 2016). Es por esto por lo que han surgido nuevas y novedosas técnicas que solventan estos problemas, como la extracción supercrítica o con fluidos presurizados.

5.3.2 Metabolitos con actividades biológicas en las hojas de olivo

El cultivo del olivo y la producción del aceite de oliva constituyen unas de las actividades más importantes del área del Mediterráneo. La dieta mediterránea es conocida por su papel protector contra enfermedades coronarias y cáncer. Así, el extracto de hoja de olivo es considerado un suplemento natural que aporta beneficios dado su papel antioxidante, quimio y cardioprotector (Qabaha et al., 2018).

Entre los diferentes constituyentes químicos de las hojas de olivo se encuentran iridoideas, polifenoles, flavonas y carbohidratos. La oleuropeína es uno de los polifenoles más biológicamente activos entre los presentes, al igual que el hidroxitirosol, obtenido de la hidrólisis de la primera (figura 2). La oleuropeína es conocida por tener efecto hipoglucémico, vasodilatador, antimicrobiano, hipotenso, antiinflamatorio, antirreumático, antiaterogénico y antipirético; en gran parte debido a sus propiedades antioxidantes. Por otro lado, el hidroxitirosol tiene poder hipoglucémico, antitrombótico, hipocolesterolémico, antiinflamatorio y antimicrobiano, además de proteger del daño oxidativo de los eritrocitos, reduciendo el riesgo de enfermedades coronarias, capacidad reguladora de la respuesta inmunológica e importante actividad anticancerígena (Haloui et al., 2011).

Los procesos de extracción seleccionados para obtener extractos a partir de las hojas de olivo, aprovechan la solubilidad en agua de una gran cantidad de moléculas contenidas (Gorzynik-Debicka et al., 2018). Por ello, la extracción con líquidos presurizados constituye una óptima opción para mejorar los rendimientos obtenidos por técnicas convencionales.

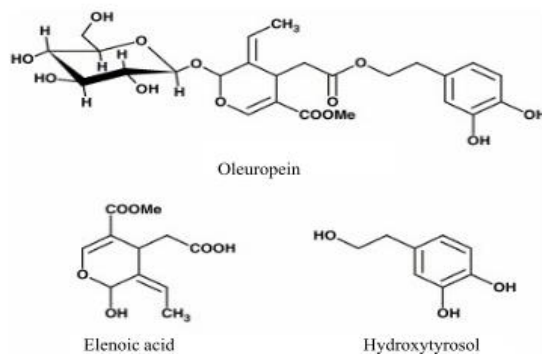


Figura 2: Estructura de la oleuropeína y los productos de su degradación (Haloui et al., 2011)

5.3.3 Metabolitos con actividades biológicas en el hollejo de uva tinta

En la industria vinífera, una alta proporción de los polifenoles existentes en las uvas permanecen en el hollejo formado (figura 3A). Se postula que este residuo formado por semillas, piel y pequeñas ramas sea una importante fuente de compuestos bioactivos (Jara-Palacios et al., 2015).

Los compuestos fenólicos que se encuentran en el vino y uvas pueden clasificarse en tres grupos principales. Los ácidos fenólicos, como el ácido hidroxibenzoico y ácido hidroxicinámico; flavonoides, como catequinas, flavonoles y antocianinas (figura 3B); y proantocianidinas. Gracias a éstos, los extractos de hollejo de uva han mostrado capacidad de prevención de la oxidación lipídica y la supresión del crecimiento de algunas cepas bacterianas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* y *Escherichia coli*, aunque destaca su papel antitumoral (Peixoto et al., 2018).

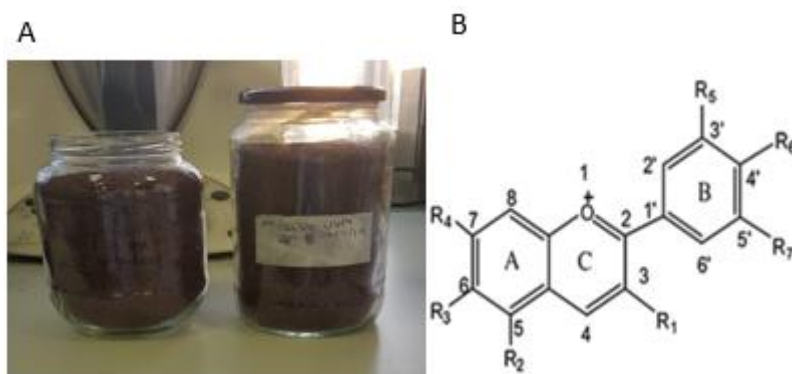


Figura 3: Hollejo de uva tinta como materia prima de la extracción PLE. A) Hollejo de uva tinta empleado en la extracción tras la molienda. B) Estructura básica de las antocianinas, compuestos fenólicos principales del hollejo (Reis et al., 2016)

Los disolventes utilizados en la extracción influyen enormemente en la composición polifenólica del extracto. Según la bibliografía, los extractos de hollejo de uva pueden mostrar una actividad prooxidante o antioxidante dependiendo del disolvente empleado. Los extractos hidroalcohólicos

tienen una actividad antiinflamatoria *in vitro*, actividad antitumoral y antimicrobiana (Brezoiu et al., 2019)

5.4. Aplicación biomédica de los extractos y estrés oxidativo

El estrés oxidativo es causado por interferencias en el balance entre agentes oxidantes y antioxidantes, desplazándose el equilibrio a favor de los elementos oxidantes o radicales libres (Liang & Kitts, 2014). Este estrés oxidativo está relacionado con multitud de enfermedades, por lo que los biocomponentes antioxidantes de los extractos analizados en este estudio podría ser de gran ayuda en el avance de novedosas terapias.

5.4.1. Enfermedades cardiacas y aterosclerosis

La importancia prestada a la aterosclerosis reside en su relación con las enfermedades cardiovasculares, una de las mayores causas de muerte en países desarrollados (Libby et al., 2019). La aterosclerosis es un proceso desarrollado de forma natural en todas las personas, avanzando generalmente con la edad. Sin embargo, en muchas circunstancias, desemboca en complicaciones aterotrombóticas, suponiendo un problema global (Salvayre et al., 2016).

El colesterol es de naturaleza liposoluble, por tanto, tiene una baja solubilidad en sangre y debe ser transportado a través del torrente sanguíneo por diferentes lipoproteínas (Libby et al., 2019). El depósito y acumulación de la lipoproteína de baja densidad (LDL), encargada del transporte del colesterol desde el hígado a otros tejidos, es el factor iniciador de las aterosclerosis (Libby et al., 2019). Este puede sufrir modificaciones cuando se encuentra acumulado en el espacio subendotelial, como oxidaciones debidas a la presencia de radicales libres y especies reactivas tales como lipooxigenasas y mieloperoxidasas, y la agregación, que resulta en la formación de complejos de tamaño entre 100 nm y 0,1 μm . En este punto, el sistema inmune juega un importante papel, ya que las células fagocíticas de la inmunidad innata (monocitos/macrófagos) localizadas en el espacio subendotelial reconocen la LDL oxidada a través de sus receptores “scavengers” y fagocitan estos agregados (Raggi et al., 2018). Los receptores “scavengers” se diferencian de los receptores de LDL en que la unión de los primeros no está sujeta a inhibición, por lo que la fagocitosis continua tanto tiempo como haya LDL oxidado (OxLDL) presente (Raggi et al., 2018). Este proceso se muestra en la figura 4.

Estas células fagocíticas que acumulan OxLDL se denominan células espumosas, y su formación depende del equilibrio existente entre elementos prooxidantes y antioxidantes en la pared arterial. Según la hipótesis oxidativa de la aterosclerosis, estas células tienen propiedades proateroscleróticas, como el incremento de la oxidación del LDL (Fuhrman et al., 2005). Además de acumularse en macrófagos, el OxLDL tiene efectos proinflamatorios y tóxicos que influyen en la fisiología de la zona afectada y provoca lesiones endoteliales. Así, en el tejido subendotelial, empiezan a convivir procesos necróticos y reparadores, como la migración de las células del

músculo liso o la formación de matriz extracelular por las células miofibroblásticas, pudiéndose dar una mejora de las lesiones o formándose placas ateroscleróticas, dependiendo fuertemente del estilo de vida adoptado. Las placas ateroscleróticas pueden estabilizarse y no causar problemas clínicos, o ser inestables y sintomáticas provocando eventos isquémicos (Salvayre et al., 2016).

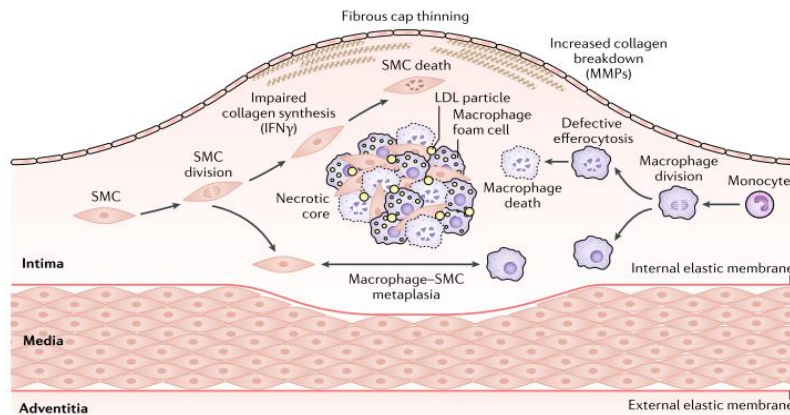


Figura 4: Progresión de la lesión aterosclerótica (Libby et al., 2019)

De esta manera, el estrés oxidativo debido a la mayor carga de agentes oxidantes respecto a los antioxidantes se convierte en una fuente de biomarcadores para las enfermedades cardiovasculares y explica por qué numerosas terapias incluyen recursos naturales fuente de agentes antioxidantes, tales como los extractos analizados en este TFG. La esperanza plasmada en este tipo de intervenciones puede deberse en parte a la observación generalizada del bajo incidente de accidentes cardiovasculares en países donde priman dietas basadas en alimentos que proporcionan sustancias antioxidantes y antiinflamatorias (Balea et al., 2018).

5.4.2. Cáncer

Algunos estudios afirman que las propiedades antioxidantes de los extractos naturales se encuentran estrechamente ligadas con su habilidad para inhibir la proliferación tumoral. Esta actividad antineoplásica se debe, por tanto, a los polifenoles que contenidos en dichos extractos (Venkata Raju et al., 2019).

Si bien es cierto que el estrés oxidativo está relacionado con el envejecimiento celular y la generación de mutaciones que desemboquen en el desarrollo de procesos cancerígenos y que el consumo de fuentes naturales ricas en antioxidantes puede ayudar a prevenir y o retrasar la aparición de los fenómenos neoplásicos, la terapia antitumoral basada en agentes antioxidantes ha dado lugar a resultados contradictorios, observándose en algunos casos que es mejor opción favorecer el estrés oxidativo en las células cancerígenas para provocar la muerte celular (Gill et al., 2016).

De cualquier manera, los polifenoles contenidos en los extractos naturales proporcionan una importante función protectora contra el cáncer de una forma menos tóxica para el organismo que las terapias químicas tradicionales (Venkata Raju et al., 2019).

5.4.3. Enfermedades neurodegenerativas

Los mecanismos que conllevan a la muerte celular en enfermedades neurodegenerativas son aún desconocidos, sin embargo, se tiene conocimiento de que el estrés oxidativo es un importante fenómeno relacionado con desórdenes neurológicos como la enfermedad de Huntington, el Alzheimer o el Parkinson (Rodríguez Graña et al., 2015)

En este sentido, una de las aplicaciones más prometedoras de los extractos naturales es proteger contra la neuropatía producida por tratamientos quimioterápicos como el oxaliplatino. Se desconoce aún la causa real de la neuropatía causada por este fármaco antineoplásico, sin embargo, está demostrado que en estas situaciones las células gliales dejan de aportar sustancias antioxidantes a las neuronas, alterando el circuito nervioso. Por tanto, el aporte de los biocomponentes antioxidantes de los extractos naturales pueden tener un efecto positivo (Micheli et al., 2018).

Por otro lado, estudios recientes afirman que la oleuropeína es capaz de estabilizar la forma monomérica de la proteína α -sinucleína, e inhibir la formación de agregados, evitando así la formación de las fibrillas tóxicas características de la enfermedad del Parkinson (Palazzi et al., 2020). Así, los extractos de hojas de olivo serían una fuente prometedora de nuevos tratamientos contra este tipo de enfermedades neurodegenerativas.

5.4.4. Enfermedades autoinmunes e inflamatorias

La diabetes mellitus es un desorden metabólico resultado de un defecto en la secreción de insulina o de su acción. La diabetes tipo II es la más común y aparece en los adultos debido a factores genéticos y a un mal estilo de vida, mientras que la diabetes tipo I es considerada una enfermedad autoinmune que se desarrolla desde la infancia. Numerosos remedios a base de plantas han sido estudiados por sus propiedades antidiabéticas, en especial, los extractos obtenidos a partir de mango (Ediriweera et al., 2017).

Por otro lado, la retinopatía diabética es una de las más graves complicaciones de esta enfermedad, que en un último término puede causar ceguera. Tanto el estrés oxidativo como el estrés osmótico son factores claves en esta patología. Las propiedades hipoglucémicas y antioxidantes de los extractos de hojas de olivo han sido evaluadas en cultivos de células fotorreceptoras, unas células neuroepiteliales encontradas en la retina, relacionando dichas propiedades con el poder neuroprotector (Benlarbi et al., 2020).

6. OBJETIVOS

Considerando la importancia que los extractos de hojas de mango y olivo, así como del hollejo de uva tinta tienen en biomedicina, el presente estudio tiene como objetivo general realizar una comparación de los procesos de extracción de las materias primas mencionadas, realizando un análisis de la composición química, así como la actividad antioxidante de los extractos obtenidos. En el estudio de extracción se analizará el efecto del disolvente empleado, utilizando agua o etanol presurizados. Esta parte del estudio se ha realizado en colaboración con el grupo de investigación de Análisis y Diseño de Procesos con Fluidos Supercríticos, del departamento de Ingeniería Química y Tecnología de los Alimentos, y en especial gracias a la ayuda de las Dras. María Teresa Fernández Ponce y Cristina Cejudo Bastante. Por otro lado, el trabajo incluye un análisis bibliográfico del potencial biomédico de los extractos mencionados previamente, gracias a la tutela de la Dra. María del Carmen Durán Ruíz profesora del Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública y al Dr. Ismael Sánchez Gomar, Investigador del grupo IN-CO23 del Instituto de Biomedicina de Cádiz (INIBICA).

Para llevar a cabo el objetivo global del trabajo se tuvieron en cuenta los siguientes objetivos específicos:

- Realizar una revisión bibliográfica sobre el tema objeto de estudio incluyendo estudios de extracción de sustancias bioactivas de las materias primas evaluadas y su potencial biomédico, especialmente, su posible aplicación en la terapia de las enfermedades cardiovasculares.
- Estudiar la extracción a alta presión de las materias primas evaluadas analizando el efecto del tipo de solvente (agua o etanol presurizados).
- Caracterizar química y funcionalmente los extractos obtenidos de las hojas de mango, hojas de olivo y hollejo de uva tinta.
- Realizar una comparativa de los extractos empleados teniendo en cuenta rendimiento de extracción, contenido fenólico, contenido en antocianos y actividad antioxidante.

7. SOLUCIÓN TÉCNICA

En este apartado se describen las materias primas utilizadas, los procedimientos seguidos y los resultados obtenidos, así como la discusión de éstos.

7.1. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1.1. Materias primas y reactivos

La materia prima a partir de cuál se obtuvieron los extractos naturales fueron hojas de mango (*Mangifera indica* L.) proporcionadas por el Instituto para la Horticultura Mediterránea y Subtropical ‘La mayora’ (IHSM), del consejo Nacional de Investigación de España (CSIC, Málaga, España); hojas de olivo (*Olea europaea*) (Olivarera San José de Lora de Estepa Sca Coop, Sevilla, España) y hollejo de uva tinta (*Vitis vinífera*) (Bodegas Luis Pérez, Jerez, España). Las hojas de mango se recolectaron en el 2018, y el hollejo y hojas de olivo en 2019. Tanto las hojas como el hollejo se dejaron secar a temperatura ambiente y se guardaron en ausencia de luz para su correcto mantenimiento. Tras esto, se procedió a la trituración de la materia orgánica (figura 5) con objeto de aumentar la superficie de contacto con el disolvente, facilitando la extracción de los compuestos de interés, pero con precaución de que el tamaño no fuera tan reducido como para obturar el filtro del extractor. Las materias primas secas y molidas se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su posterior utilización.

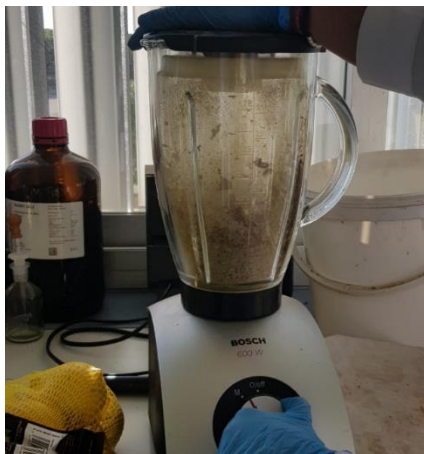


Figura 5: Trituración hojas de mango

Con respecto a la extracción, los disolventes utilizados fueron agua miliQ y etanol al 96% (Panreac), dado que se tratan de disolventes polares óptimos para la extracción de compuestos fenólicos (Fernández-Ponce et al., 2017)

El reactivo utilizado con el propósito de determinar la actividad antioxidante de los extractos fue 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Para determinar el contenido en polifenoles totales se usó el reactivo de Folin-Ciocalteu, así como carbonato de sodio para parar la reacción y ácido gálico monohidratado para realizar la curva patrón. Además, para la determinación del contenido total

en pigmentos de antocianinas de los extractos de hollejo de uva tinta, se utilizaron como reactivos clorato de Potasio, acetato de Sodio y ácido clorhídrico. Todos los químicos anteriores fueron proporcionados por la casa comercial Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

7.1.2. Equipos de extracción a alta presión

Las extracciones con líquidos presurizados se llevaron a cabo en extractores de alta presión de la firma Thar Technology modelo SF1000 y modelo SF2000. Los elementos que los componen son comunes a ambos, variando el volumen del extractor.

- **Extractor:** En el modelo SF1000 se trata de un cilindro de acero inoxidable de 1L de capacidad, mientras que en el modelo SF2000 la capacidad es de 2L. La presión, que puede medirse y controlarse gracias a la presencia de un manómetro, se mantiene constante en su interior gracias a la junta de sellado que proporciona un cierre hermético. El aporte calorífico se realiza mediante un encamisado externo y la temperatura interna y externa se mide con dos termopares. Además, cuenta con filtros a la entrada y salida de un tamaño de poro de 2 μm .
- **Bombas de alta presión:** El sistema cuenta con dos bombas de alta presión de doble pistón de la firma Thar Technology, una modelo P100 para impulsar el CO_2 y otra modelo P50 para impulsar el co-disolvente. En este caso, solo se usó la bomba de co-disolvente, dado que los disolventes empleados fueron agua o etanol en cada caso, de forma que el co-disolvente pasa a ser el disolvente principal.
- **Pre calentador:** Ubicado previamente al extractor. La función de este intercambiador de calor de alta presión es llevar el disolvente a la temperatura de trabajo.
- **Válvula automatizada de regulación de presión (BPR):** Válvula de seguridad automática localizada posteriormente al extractor, cuya función es mantener en el interior del extractor la presión de trabajo, de manera que si se sobrepasa dicha presión se abre hasta que vuelva a bajar del valor premisa. Se encuentra termostatizada, para, en el caso de trabajar con CO_2 evitar la congelación por la despresurización de este.
- **Separador ciclónico:** Segundo recipiente de acero inoxidable de 0,5 L de capacidad, utilizado para recoger el extracto cuando se trabaja en continuo. En este caso, se trabajó en discontinuo, permaneciendo el extracto todo el tiempo en el extractor, por lo que no se usó el separador ciclónico.
- **Tuberías y válvulas:** Todo el equipo está conectado por un sistema de tuberías de 1/8 pulgadas y válvulas.
- **Software:** Las variables medidas y controladas por el software “Process Suite” (Thar Technology) son el caudal del flujo, la presión en el extractor, la presión de la BPR, y las temperaturas del pre calentador, de la camisa y los dos termopares

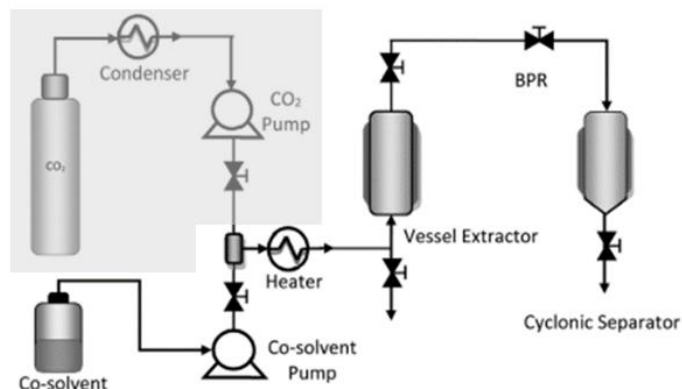


Figura 6: Diagrama modelo del equipo de extracción supercrítica (Fernández-Ponce et al., 2017)

7.1.3. Otros equipos:

Además de los equipos de extracción, los siguientes equipos fueron necesarios en la realización del trabajo experimental:

- Baño de ultrasonido Modelo 514. de SELECTA de 50 kHz: Fue utilizado para asegurar la correcta realización de la disolución madre de DPPH en el análisis de la capacidad antioxidante.
- Balanza de precisión Mettler Toledo AG135: Para la medida de los extractos secos en la determinación de la concentración y el rendimiento
- Balanza Gram-precision serie STB-8K: Para la preparación de reactivos
- Cámara frigorífica: Usada para la correcta conservación de los extractos
- Lector de microplaca Epoch2 de BioTek: Utilizado para realizar las medidas espectrofotométricas en los análisis del contenido total de polifenoles, antocianos y capacidad antioxidante mediante el software “Gen5”.
- Evaporador rotativo Laborota 4000-efficient de Heidolph: usado para evaporar los disolventes de los extractos en la determinación de la concentración y rendimiento de la extracción.

7.1.4. Metodología de extracción con líquidos presurizados:

Como ya se describió anteriormente, la extracción con líquidos presurizados se efectuó con los equipos de la firma Thar Technology. Los extractos de hojas de mango y los de hollejo de uva tinta, tanto con agua miliQ como con etanol, se llevaron a cabo en el modelo SF2000. Los extractos de hoja de olivo, tanto con agua miliQ como con etanol, se realizaron en el modelo SF1000.

Un paso fundamental previo a la extracción fue purgar la bomba del co-disolvente, de esta manera se eliminó el aire, llenándose completamente el circuito de aspiración del disolvente. En este paso,

se hizo uso de la válvula MV8, abriendo y cerrando las llaves de la purga y la del sistema correspondientemente. Se encendió la bomba estableciéndose un caudal de 5 g/min, la cual se detiene una vez el disolvente salía de forma constante, devolviendo las llaves de la válvula a su estado inicial.

Tras esto, se introdujo el cartucho de papel que contiene el material orgánico previamente triturado y pesado en el vaso extractor, llenando con el disolvente correspondiente hasta la altura del termopar. Seguidamente al cierre del extractor, se comprobó que todas las conexiones están debidamente ocluidas.

A continuación, se establecieron las diferentes variables en el software “Process suit” (Thar Technology), tanto las temperaturas del precalentador y del extractor como el caudal de la bomba y la presión de operación. Se bombeó el disolvente correspondiente, agua o etanol a través de la bomba de co-disolvente y una vez alcanzada la presión de operación se mantuvo la presión del sistema constante gracias a la acción de la válvula reguladora de presión (BPR). Cuando la presión indicada por la BPR era la de trabajo, se apagó la bomba y se dejó la extracción durante el tiempo de operación. Se operó de manera discontinua o estática, por lo que el extracto obtenido permaneció en todo momento en el interior del vaso extractor, favoreciendo el enriquecimiento del mismo en los compuestos de interés, sin pasar al separador ciclónico. Una vez transcurrido el tiempo de extracción, se apagaron las temperaturas, se despresurizó el sistema y se procedió a la recolección del extracto. Al finalizar cada extracción, el sistema completo se limpió con acetona.

Las condiciones de trabajo se fijaron a una presión de 200 bar, temperatura de 80 °C y un tiempo de extracción de 12 h en modo estático. Se introdujo una cantidad de muestra entre 100 y 500 g dependiendo el tipo de extractor utilizado. Las condiciones de extracción se seleccionaron teniendo en cuenta estudios previos realizados por el grupo de investigación “Análisis y Diseño de Procesos con Fluidos Supercríticos” TEP128 (Fernández-Ponce et al., 2015) (Fernández-Ponce et al., 2016).

7.1.5. Rendimiento de la extracción

El rendimiento es el parámetro que mide la masa de extracto seco obtenido en función de la masa de materia prima inicial empleada. La determinación del rendimiento se realiza por gravimetría, se secan alícuotas de un volumen conocido de extracto en el rotavapor, y por diferencia del peso del matraz vacío y conteniendo el extracto seco, se determina la masa de extracto seco contenido en el volumen de alícuota usado. Mediante las siguientes expresiones matemáticas, se calcula la concentración del extracto y se determina el rendimiento, referido al volumen total de extracto obtenido tal como se indica en las ecuaciones [1] y [2].

$$\text{Concentración del extracto } \left(\frac{g}{mL} \right) = \frac{\text{Masa del extracto seco (g)}}{\text{Volumen de alícuota (mL)}} \quad [1]$$

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Concentración del extracto } \left(\frac{g}{mL}\right) \times \text{Volumen total del extracto (mL)}}{\text{Masa inicial de materia prima (g)}} \times 100 \quad [2]$$

7.1.6. Caracterización química de los extractos

Los extractos fueron caracterizados químicamente teniendo en cuenta el contenido total de polifenoles y en el caso del extracto de hollejo también se determinó el contenido total de antocianos. A continuación, se describen en detalle los métodos empleados.

7.1.6.1. Análisis del contenido en polifenoles totales (TPC)

Para el análisis del contenido total en polifenoles de los extractos, se siguió el método de Folin-Ciocalteu. Primeramente, se preparó una solución madre de ácido gálico en agua a una concentración de 1000 ppm. Este compuesto orgánico fue empleado como patrón para determinar el contenido total en polifenoles de los extractos. Tras esto, a partir de la solución madre de ácido gálico, se realizaron 7 disoluciones seriadas (300, 150, 100, 75, 50, 25 y 15 ppm), en un volumen total de 1 ml, usando agua miliQ como disolvente.

Para cada extracto se analizaron varias concentraciones por triplicado. El test consistió en añadir para cada muestra 200 μL de agua miliQ, 12,5 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 12,5 μL del extracto pertinente. Para los controles se añadieron los mismos reactivos en las mismas proporciones exceptuando el extracto, que se substituyó por el mismo volumen de agua miliQ o etanol dependiendo del tipo de extracto (acuoso o etanólico). Para los blancos se añadió 250 μL de agua miliQ y 25 μL de agua miliQ o etanol. En la tabla 1 se presentan las concentraciones preparadas para cada extracto, así como la concentración final en la reacción.

Tabla 1: Concentraciones de las muestras para la determinación del contenido en polifenoles totales

		Concentración diluciones (ppm)	Concentración real en la reacción (ppm)
Mango	Acuoso	1000	50
		500	25
	Etanólico	375	18.75
		281.25	14.0625
		210.94	10.547
Olivo	Acuoso	3000	150
		2000	100
	Etanólico	3000	150
		2000	100
Hollejo	Acuoso	5000	250
		2500	125
	Etanólico	2000	100
		1000	50

Tras 2 horas de reacción, se añadió 25 μL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) a cada pocillo para parar la reacción (incluidos controles y blancos, para eliminar la posible interferencia del reactivo en la medida de la absorbancia). Posteriormente se midió la absorbancia a una longitud de onda

de 725 nm en un lector de microplacas Epoch2 (Biotek), con el software “Gen5”. La medida de absorbancia se realizó tanto a las muestras como a las diluciones de la recta patrón.

Una vez obtenidas las absorbancias, se llevó a cabo el análisis de datos. Para ello, se realizó una recta patrón (Figura 7), representando la absorbancia en el eje frente a la concentración de ácido gálico (AG) en la reacción.

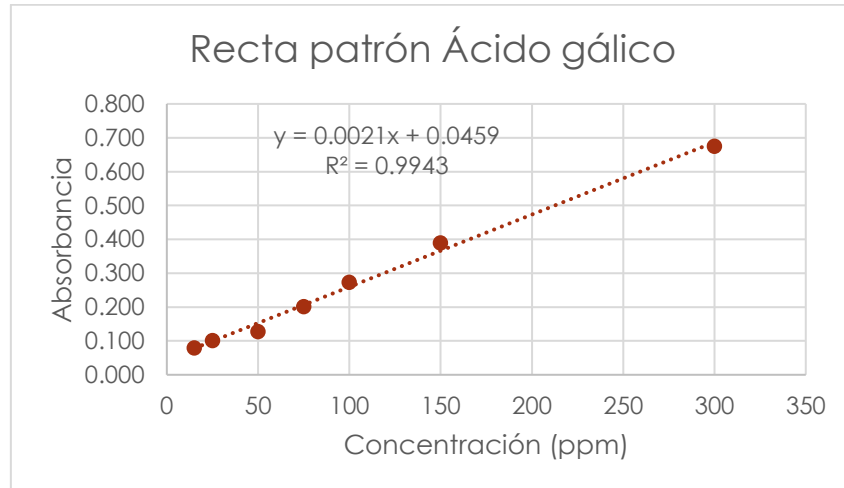


Figura 7: Recta patrón de ácido gálico.

La concentración de polifenoles totales en los extractos se determina como microgramos de ácido gálico equivalentes por cada 100 microgramos de ácido gálico ($\frac{\mu\text{g AG eq}}{100 \mu\text{g extracto}}$), según la ecuación [3].

$$\left(\frac{\mu\text{g AG eq}}{100 \mu\text{g extracto}}\right) = \beta \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times \frac{V \text{ total reacción } (\mu\text{L})}{V \text{ de extracto añadido en la reacción } (\mu\text{L})} \times \frac{1}{C \text{ del extracto}} \times 100 \quad [3]$$

Donde, β es la concentración determinada al interpolar en la recta patrón según la absorbancia obtenida.

7.1.6.2. Análisis del contenido total en antocianos

Con el propósito de realizar el análisis del contenido total en antocianos, se siguió la siguiente metodología que se basa en la coloración que adquieren los pigmentos de antocianinas a pH ácido cercano a 1, debido la adquisición de la estructura estable de catión flavilio (2-fenil-benzopirilio) y el cambio que sufre esta estructura a pH 4,5 e hidratación, convirtiéndose en la base carbinol, incolora (Brezoiu et al., 2019).

El método se aplicó solo a los extractos de hollejo de uva tinta. En el caso del extracto a base de agua miliQ, se realizó una dilución previa de concentración 8000 ppm en un volumen de 1 mL, y una dilución de concentración 2000 ppm para el extracto con etanol. A su vez, se llevó a cabo la preparación de dos soluciones tampón: una solución de acetato de Sodio 0,4M, en un volumen de

1000 mL, a pH 4,5, ajustado con HCl concentrado; y una solución de clorato de Potasio, 0,025 M, en un volumen de 1000 mL, a pH 1,0, ajustado con HCl concentrado.

Posteriormente, las soluciones de 8000 y 2000 ppm previamente preparadas se diluyeron a razón 1:5 con los tampones preparados, obteniéndose dos diluciones por cada extracto, uno la solución tampón a pH 1 y otro con la disolución a pH 4,5.

De nuevo, se utilizó el lector de microplacas Epoch2 (Biotek) con el software “Gen5”, para la medida de la absorbancia de las muestras, constituidas por 250 μ L de las diluciones previamente mencionadas, y los blancos que consistieron en 250 μ L de la correspondiente disolución de acetato de sodio o clorato de potasio.

En lo referido al análisis de datos, primeramente, se calculó la absorbancia de la muestra diluída según la siguiente ecuación [4].

$$A = (A_{520-A700})_{pH1} - (A_{520-A700})_{pH4.5} [4]$$

Seguidamente, se determinó la concentración de antocianina monomérica (AM) según la ecuación siguiente [5] :

$$\text{Antocianina monomérica} \left(\frac{mg}{g} \right) = \frac{(A \times PM \times FD \times 1000) / (e \times 0.71)}{[C.\text{extracto original}]} [5]$$

donde A= Absorbancia calculada previamente; PM= Peso molecular de la antocianina predominante en la muestra. En nuestro caso, se trata de la cianidina 3-glucósido (449,2 g/mol); FD= Factor de dilución de los tampones. Las diluciones realizadas con los tampones a partir de los extractos son 1:5; Se multiplica por 1000 para realizar la conversión de gramos a miligramos; e = Absortividad molar de la antocianina predominante en la muestra, como ocurre en nuestro caso, cuando pipeteamos un volumen de 250 μ L en la microplaca, el valor de este parámetro es de 26900 L/mol/cm; la concentración extracto original en g/L.

De esta manera, se obtuvo la concentración de antocianina monomérica por gramo de extracto original. Para expresar los resultados por cada 100 g de extracto original, se multiplica por 100.

7.1.7. Caracterización funcional de los extractos

En este apartado se realizó un análisis de la capacidad antioxidante de los extractos, así como una búsqueda bibliográfica de sus aplicaciones biomédicas derivadas de sus actividades biológicas.

7.1.7.1. Análisis de la actividad antioxidante

Dada la importante relación entre la capacidad antioxidante de algunos extractos vegetales y su función cardioprotectora (Balea et al., 2018), el primero de los análisis realizados fue comprobar dicha capacidad mediante el método descrito por Brand-Williams et al. (1995) y Scherer & Godoy (2009), basado en la capacidad de absorción del compuesto 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)

a una longitud de onda de 515 nm. Cuando este radical libre, caracterizado por la intensa coloración púrpura de sus disoluciones, es reducido por un compuesto antioxidante, pierde tanto su coloración, que pasa a ser amarillenta, como su capacidad de absorción a la longitud de onda mencionada previamente (Figura 8).

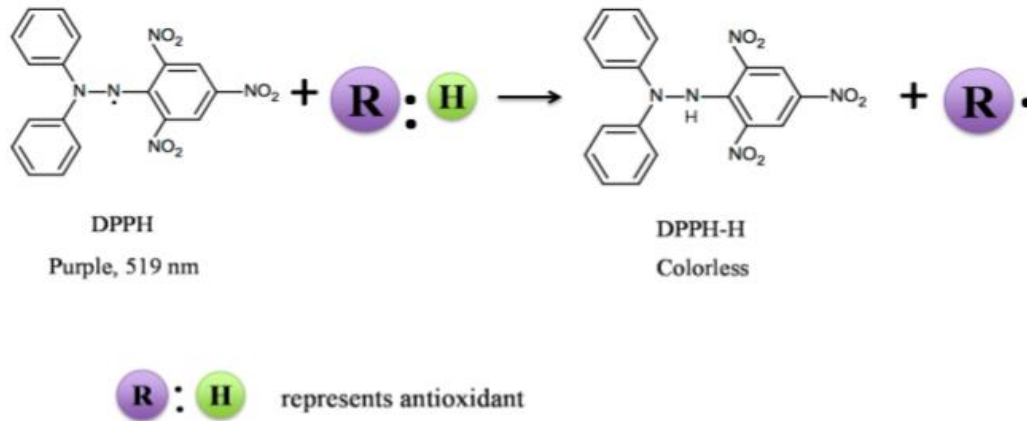


Figura 8: Reacción de oxidación del DPPH en presencia de un antioxidante (Liang & Kitts, 2014)

Inicialmente, se realizó una disolución madre de DPPH en un volumen de 50 mL a una concentración de 6×10^{-4} M, que fue aislada de la luz y congelada para posteriores usos. A partir de la disolución madre, se preparó una disolución de trabajo a concentración 6×10^{-5} M. El disolvente utilizado para las diluciones fue etanol al 96%. Para facilitar la disolución del DPPH, particularmente en la preparación de la disolución madre, se necesitó el baño de ultrasonido Modelo 514 (SELECTA).

Para el análisis se utilizó una placa de 96 pocillos en la que se midió la absorbancia de muestras de 6 concentraciones diferentes de cada extracto por duplicado en un rango 0-5000 ppm. La absorbancia fue medida en un lector de microplacas Epoch2 (Biotek) con el software “Gen5”. A cada muestra se le añadía 293 μ L de la dilución pertinente de extracto y 7 μ L de DPPH 6×10^{-5} M. Los controles se prepararon de igual manera que las muestras, pero en lugar de añadir DPPH se agregó 7 μ L de agua miliQ o etanol. El blanco fue 300 μ L de etanol. En la tabla 2 se observan las concentraciones estudiadas para cada extracto, y se incluye además la concentración en la reacción teniendo en cuenta que la relación de los reactivos añadidos.

Durante el tiempo de reacción, que fue 2 horas, se realizó una medida de la absorbancia a 515 nm cada 5 minutos, empleando un lector de microplaca Epoch2 (Biotek) y el software “5Gen”, con el fin de determinar el punto en que se estabiliza la reacción y se alcanza el estado estacionario, De esta manera, se determina el porcentaje de DPPH remanente en el estado estacionario teniendo en cuenta la absorbancia inicial y la absorbancia final en el estado estacionario, según la ecuación 6.

$$\%DPPH \text{ remanente} = \frac{\text{Absorbancia final}}{\text{Absorbancia inicial}} * 100 \quad [6]$$

Tabla 2: Concentraciones de los extractos en el análisis de la actividad antioxidante

	Extractos acuosos		Extractos etanólicos	
	Concentración	Concentración en la reacción	Concentración	Concentración en la reacción
Mango	2000	46.667	281.25	6.563
	1000	23.333	210.94	4.922
	500	11.667	158.2	3.691
	250	5.833	118.65	2.769
	125	2.917	66.74	1.557
	62.5	1.458	37.54	0.876
	Olivo	3000	70.000	3000
2000		46.667	2000	46.667
1000		23.333	1000	23.333
500		11.667	500	11.667
250		5.833	250	5.833
125		2.917	125	2.917
Hollejo	5000	116.667	2000	46.667
	2500	58.333	1000	23.333
	1250	29.167	500	11.667
	625	14.583	250	5.833
	312.5	7.292	125	2.917
	156.25	3.646	62.5	1.458

Seguidamente, se representó la concentración de extracto real en la reacción frente la concentración de DPPH remanente, ajustando a una línea de tendencia polinómica de segundo grado (figura 9). Se calculó la concentración efectiva media máxima, EC_{50} promedio, concentración de extracto a la cual se reduce el 50% de DPPH, y la desviación estándar.

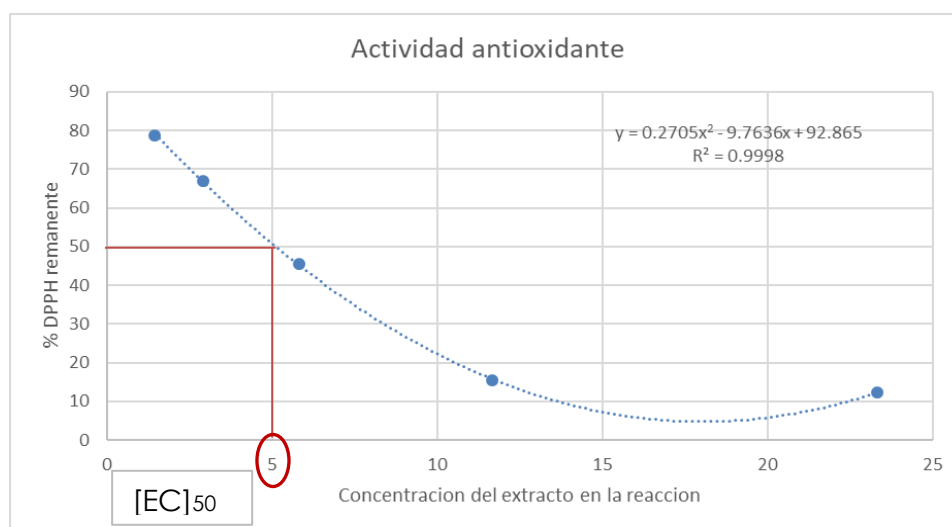


Figura 9: Representación del porcentaje de DPPH remanente frente a la concentración de extracto. Determinación gráfica de la concentración efectiva máxima (EC_{50}). Datos recogidos del extracto de hojas de mango a base de etanol.

Aunque la concentración efectiva máxima (EC_{50}) sea un factor característico de la sustancia, depende de la concentración de DPPH inicial.

Por tanto, se determinó el índice de actividad antioxidante (AAI). Este es un parámetro estandarizado, de manera que se eliminó el problema anterior de la dependencia de la concentración inicial de DPPH. Se calculó para cada réplica, siguiendo la siguiente expresión matemática [7] y se realizó el promedio.

$$AAI = \frac{EC_{50}}{[DPPH]_0 \text{ en la reacción}} \quad [7]$$

Para calcular AAI, se calculó previamente la concentración inicial de DPPH en cada pocillo ($[DPPH]_0$), según la ecuación [8]

$$[DPPH]_0 = 6 \times 10^{-5} \frac{mol}{L} \times \frac{394,32 g}{1 mol} \times \frac{10^6 \mu g}{1 g} \times \frac{1 L}{10^3 ml} = 23,66 \mu g/ml \quad [8]$$

Teniendo en cuenta que se añadió 293 μ L de solución de trabajo y 7 μ L de extracto:

$$[DPPH]_0 \text{ en la reacción} = 23,66 \frac{\mu g}{ml} \times \frac{293 \mu L}{300 \mu L} = 23,11 \frac{\mu g}{ml} = ppm \quad [9]$$

Cuanto menor sea la concentración efectiva máxima (EC_{50}) y mayor sea el índice de actividad antioxidante (AAI), mayor actividad antioxidante presentará el extracto.

7.1.8. Análisis estadísticos

Para el estudio de las variables influyentes en la obtención de extractos de hojas de mango, olivo y hollejo de uva tinta, el disolvente empleado y la materia prima de partida, se llevó a cabo un tratamiento estadístico de análisis de la varianza (ANOVA), mediante el software “STATGRAPHICS Plus 4.0”, tomando como variables respuesta el contenido total en polifenoles (TPC), la concentración efectiva máxima (EC_{50}), y el índice de actividad antioxidante (AAI). Para entender los resultados es necesario tener en cuenta que en el caso del factor materia prima (A), a la hoja de mango se le dio un valor de -1, a la hoja de olivo un valor de 0 y al hollejo de uva tinta un valor de +1, mientras que para el factor solvente (B), el agua tiene un valor de -1 y el etanol de +1. Se realizaron 6 muestras y 2 réplicas. Los resultados se consideran significativos con un P-valor menor a 0,05.

7.1.9. Búsqueda bibliográfica de las aplicaciones biomédicas de los extractos

La búsqueda bibliográfica sobre las aplicaciones biomédicas de los extractos se centró en las aplicaciones en el área de las enfermedades cardiovasculares y arteriosclerosis. Las herramientas de búsquedas empleadas fueron Pubmed y Scopus, utilizando como palabras clave: “Mango leaves extract”, “Olive leaves extract”, “grape skin extract”, “atherosclerosis”, “biomedical applications”, “cardiovascular diseases applications”, “cell proliferation and migration”, “angiogenesis”.

7.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.2.1. Extracción con líquidos presurizados (PLE)

En este estudio, todas las extracciones se llevaron a cabo por el método de extracción con líquidos presurizados (PLE por sus siglas en inglés).

La elección de la técnica se basó, primeramente, en las ventajas que presenta frente a las **técnicas convencionales**, como la automatización, el ahorro económico y de energía, el mayor rendimiento, el empleo de disolventes no contaminantes y la ausencia de luz que evita la degradación de los compuestos de interés (Hurtado, 2018). De hecho, en un estudio en el que se comparó la extracción de los polifenoles de las hojas de mango mediante las técnicas PLE y Soxhlet (Fernández-Ponce et al., 2015) se encontró que aunque los rendimientos fueron similares, la extracción PLE intensificó la actividad antioxidante (AAI) de dichos extractos.

Comparando con otras técnicas de alta presión, la preferencia de la técnica usada, PLE, se debe a que permite la mejor solubilización de los compuestos fenólicos de interés en disolventes polares (Fernández-Ponce et al., 2016), tal y como se justificará posteriormente.

Las condiciones de temperatura y presión fueron optimizadas en estudios anteriores (Fernández-Ponce et al., 2015) (Fernández-Ponce et al., 2017). De este modo, todas las extracciones se llevaron a cabo a 80° C y 200 bar. La importancia del disolvente radica no solo en la composición final del extracto, sino también en sus propiedades biológicas (Fernández-Ponce et al., 2017). Los disolventes usados fueron agua y etanol. Se evaluó la eficacia de ambos.

En la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos para el diseño experimental donde se evalúa el efecto de la materia prima y el tipo de disolvente con respecto al rendimiento global de extracción, la actividad antioxidante en término de EC50 e índice de actividad antioxidante (AAI) y contenido total de polifenoles (TPC).

Tabla 3. Diseño de experimentos realizados en la parte experimental del estudio.

	Disolvente	Materia prima	Bloque	EC50 (µg/ml; ppm)	AAI (µg DPPH/µg extracto)	TPC (µg AGE/100 µg de extracto)	Rendimiento global de extracción (%)
MW	-1	-1	1	5,12	4,52	29,32	19,25
ME	1	-1	1	2,32	9,96	35,54	9,47
OW	-1	0	1	30,11	0,77	6,78	14,9
OE	1	0	1	20	1,16	5,02	20,94
GPW	-1	1	1	40,92	0,56	5,79	7,36
GPE	1	1	1	6,86	3,37	7,86	7,05
MW	-1	-1	2	5,39	4,283	28,4	19,25
ME	1	-1	2	2,04	11,32	35,54	9,47
OW	-1	0	2	26,22	0,08	6,72	14,9
OE	1	0	2	24,55	0,94	6,27	20,94
GPW	-1	1	2	34,95	0,66	7,05	7,36
GPE	1	1	2	7,87	2,94	7,63	7,05

*TPC: Total polyphenol content (Contenido total en polifenoles)

*MW/ME: Mango agua/mango etanol

OW/OE: olivo agua/olivo etanol

GPW/GPE: Hollejo agua/hollejo etanol

7.2.2. Rendimiento global

En la siguiente gráfica (figura 10) se observan los rendimientos globales obtenidos según la materia prima y el disolvente empleado. En el caso de los extractos de hojas de mango y de hollejo se obtuvo un mayor rendimiento en los extractos acuosos que en los etanólicos, mientras que en el extracto de hojas de olivo se obtuvo mayor rendimiento en el extracto etanólico que en el acuoso. La materia prima con la que menor rendimiento se obtuvo fue con el hollejo de uva tinta en todos los casos. Al emplear agua como disolvente, el mayor rendimiento se obtuvo con las hojas de mango, mientras que al emplear etanol el rendimiento fue mayor con las hojas de olivo.

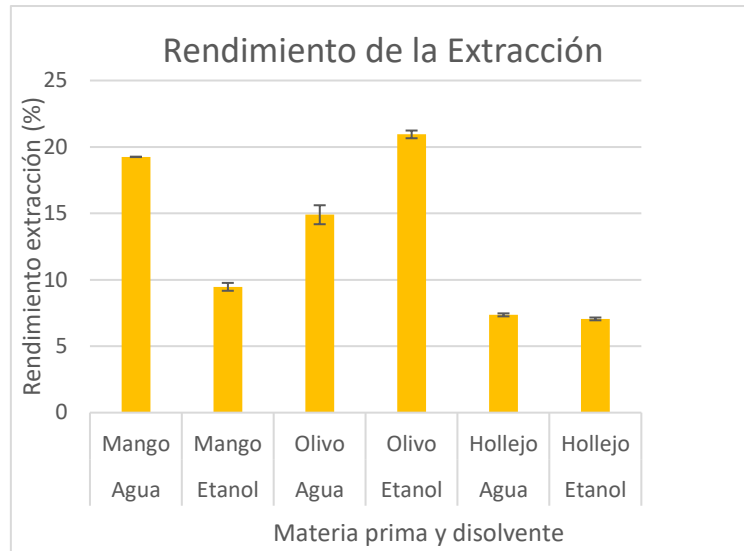


Figura 10: Diagrama de bloques del rendimiento global según la materia prima y el disolvente

Comparando los resultados obtenidos con la bibliografía, encontramos que los rendimientos obtenidos en este TFG en la extracción de **hojas de mango**, 19,25% y 9,47% en los extractos acuosos y etanólicos respectivamente, fueron menores que los obtenidos por PLE en un estudio anterior, en el que el rendimiento al emplear etanol fue de un 37% (Fernández-Ponce et al., 2016). Las diferencias en el rendimiento pueden deberse al año y periodo de recolección que provocan cambios en las sustancias activas presentes en la planta.

Los rendimientos obtenidos en los extractos de **hojas de olivo** también fueron menores en comparación con la bibliografía. En nuestro caso, se obtuvieron unos rendimientos del 20,95% al emplear etanol como disolvente y de un 14,90% al emplear agua, resultados considerablemente menores al 26,4% y 41,5% al emplear etanol y agua respectivamente en un estudio en el que se pretendió realizar una extracción verde de las hojas de olivo (Xynos et al., 2012). Estas diferencias pueden deberse a que las condiciones de operación fueron diferentes. En este TFG se mantuvieron unas condiciones es de 80 °C y 200 bar, en el estudio previamente mencionado (Xynos et al., 2012) tales condiciones fueron de 103,4 bares y una temperatura de 150 °C en la extracción acuosa y 115 °C en la etanólica. Aunque la presión fuese menor, el aumento de temperatura puede haber incrementado la solubilidad de los compuestos, aumentando el rendimiento.

No existen muchos estudios que analicen el efecto del disolvente en el rendimiento de la extracción de **hollejo de uva tinta**, pero en nuestro caso el rendimiento fue similar en la extracción acuosa (7,36%) y en la etanólica (7,05%). Un estudio realizado para comparar distintas técnicas de extracción verdes del orujo de varias variedades de uva tinta (Otero-Pareja et al., 2015) afirmó que los mejores resultados se obtienen al usar la técnica PLE con etanol.

Tras el análisis estadístico del efecto de las variables de operación (tipo de materia prima y disolvente) en el rendimiento de extracción, se observa en el gráfico de Pareto (figura 11 A) que

la variable más significativa que afecta el proceso de extracción es la materia prima (A), mientras que, el disolvente empleado (B) y la interacción entre la materia prima y el disolvente (AB) no tiene una influencia significativa. Estos resultados son respaldados por la tabla ANOVA del rendimiento global (tabla 4), en la que un P-valor menor que 0,05 indica que la variable es significativa y la gráfica (figura 11B), que confirma que la materia prima con la que mejor rendimiento se obtuvo fue el olivo (raw material 0), seguido del mango (raw material -1) y el hollejo (raw material -1).

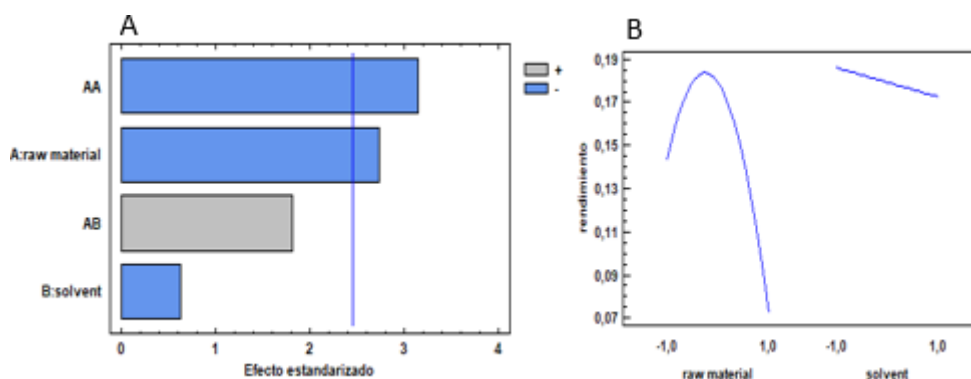


Figura 11: Análisis estadístico del rendimiento global. A) Diagrama de Pareto estandarizado del análisis estadístico del rendimiento global. B) Gráfica del análisis estadístico del rendimiento global: Diagrama de Pareto estandarizado

Tabla 4: Tabla ANOVA del rendimiento global

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:raw material	0,0102346	1	0,0102346	7,45	0,0342
B:solvent	0,000543809	1	0,000543809	0,40	0,5524
AA	0,0135836	1	0,0135836	9,89	0,0200
AB	0,00449176	1	0,00449176	3,27	0,1206
bloques	0,0000294647	1	0,0000294647	0,02	0,8884
Error total	0,00824261	6	0,00137377		
Total (corr.)	0,0371259	11			

7.2.3. Caracterización química de los extractos

7.2.3.1. Contenido en polifenoles totales

El contenido en polifenoles totales (TPC) obtenido según la materia prima y el disolvente empleado se observa en la siguiente gráfica (figura 12). Comparando las distintas materias primas, el mayor contenido en polifenoles se obtuvo en los extractos de hojas de mango, seguido de los extractos de hollejo de uva tinta y hojas de olivo, observándose que el mayor contenido polifenólico se relacionó con el empleo de etanol frente al uso de agua como disolvente, excepto en el caso del extracto de hojas de olivo, en el que el mayor contenido en polifenoles se obtuvo al emplear agua.

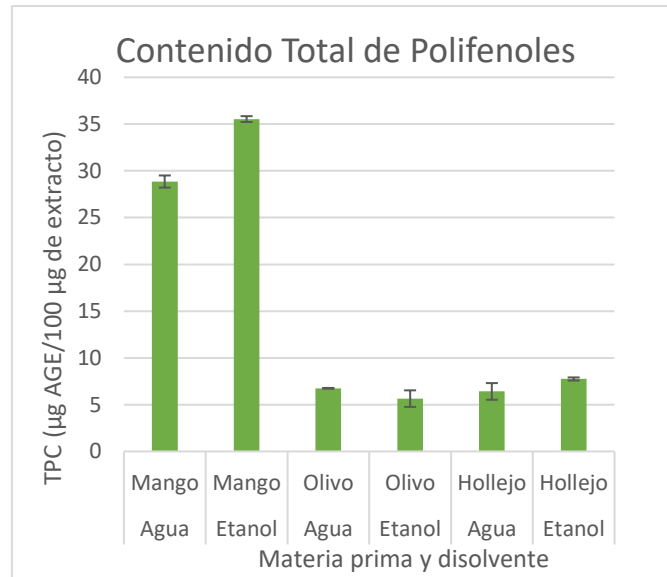


Figura 12: Diagrama de bloques del contenido total en polifenoles (TPC) según la materia prima y el disolvente

Los resultados de TPC obtenidos en este TFG en los extractos de **hojas de mango**, 28,859 y 35,355 µg AGE/100 µg de extracto, en el extracto acuoso y etanólico respectivamente, son notablemente superiores a los obtenidos en otro estudio (Kulkarni & Rathod, 2018) en el que en extractos acuosos de hojas de mango obtenidos por microondas, el mayor TPC fue de 0,064 µg AGE/100 µg de extracto. El mayor TPC muestra la capacidad de la técnica de PLE para recuperar compuestos fenólicos a partir de esta materia prima en comparación con otras técnicas de extracción como la extracción asistida por microondas. Los resultados obtenidos en este TFG también fueron superiores a los obtenidos en otro estudio (Castro-Vargas et al., 2019), donde el mayor valor de TPC se obtuvo en un extracto etanólico de piel de mango, 3,553 µg AGE/100 µg de extracto. Esto demuestra que las hojas de mango es una rica fuente en polifenoles, comparando con otras partes de la planta. Sin embargo, los resultados de este TFG fueron menores al obtenido previamente en otro estudio en el que el mayor TPC obtenido en un extracto etanólico de hojas de mango mediante la técnica PLE fue de 41,99 µg AGE/100 µg de extracto. Las diferencias pueden deberse en este último caso, al año y periodo de recolección que provocan cambios en las sustancias activas presentes en la planta, así como diferencias en el tratamiento de la materia prima (mayor o menor tamaño de partícula tras la molienda) o a desviaciones en las condiciones de presión o temperatura.

En cuanto a los extractos de **hojas de olivo**, los resultados de TPC, 6,747 y 5,641 µg AGE/100 µg de extractos acuosos y etanólicos respectivamente, fueron similares a los obtenidos en un estudio previo, (Putnik et al., 2017), en el que los valores de TPC oscilaron entre 4,113 y 6,299 µg AGE/100 µg de extracto, en unas extracciones PLE en las que se empleó como disolvente una mezcla de hidroalcohólica al 50%.

Los TPC obtenidos en este TFG para los extractos de **hollejo de uva tinta** fueron mayores en la extracción etanólica ($7,748 \pm 0,165 \mu\text{g AGEq}/ 100 \mu\text{g extracto}$) que en la acuosa ($6,416 \pm 0,892 \mu\text{g AGEq}/ 100 \mu\text{g extracto}$). El resultado fue menor al obtenido en un estudio anterior (Otero-Pareja et al., 2015), en el que se encontró que el TPC obtenido con PLE era mayor al usar mezclas hidroalcohólicas ($49,7 \pm 0,5 \mu\text{g AGEq}/ 100 \mu\text{g extracto}$) que al usar solo etanol ($20,5 \pm 0,9 \mu\text{g AGEq}/ 100 \mu\text{g extracto}$) o agua ($33, \pm 0,9 \mu\text{g AGEq}/ 100 \mu\text{g extracto}$), atribuyendo que las mezclas hidroalcohólicas funcionan mejor porque la fase orgánica mejora la solubilidad y la acuosa incrementa la desorción del analito. El menor contenido en polifenoles obtenidos en el presente estudio puede deberse a las condiciones de cosecha y la fecha de recolección de la materia prima.

En el siguiente gráfico de Pareto (figura 13A), se muestra el resultado del análisis estadístico del efecto de las distintas variables sobre el contenido en polifenoles totales (TPC), observándose que la materia prima de partida (A) es la variable que tiene una influencia más significativa. El disolvente empleado (B) y la interacción de la materia prima y el disolvente (AB) no tienen una influencia significativa. Estos resultados se respaldan en la tabla ANOVA (tabla 5), en la que un P-valor menor que 0,05 muestra que la variable es significativa, la gráfica (figura 13B) que afirma que el mayor TPC se obtuvo con el mango (raw material -1), seguido del hollejo (raw material 1) y el olivo (raw material 0).

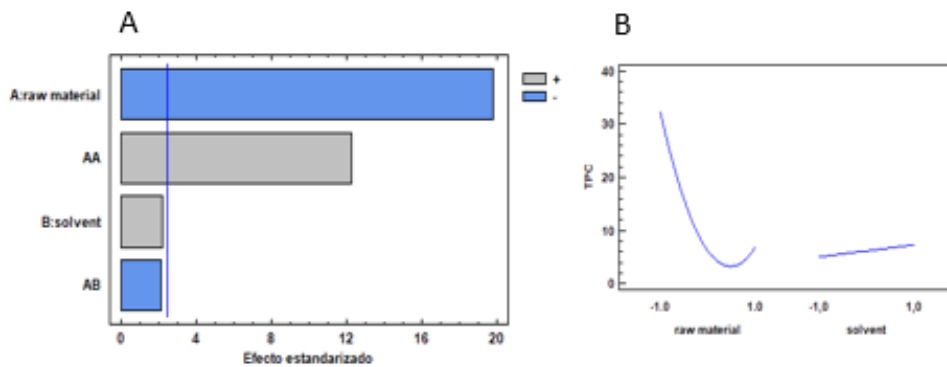


Figura 13: Análisis estadístico del TPC. A) Diagrama de Pareto estandarizado para el TPC. B) Gráfica del análisis estadístico del TPC

Tabla 5: Tabla ANOVA del TPC

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:raw material	1261,6	1	1261,6	392,78	0,0000
B:solvent	15,9091	1	15,9091	4,95	0,0677
AA	481,896	1	481,896	150,03	0,0000
AB	14,2872	1	14,2872	4,45	0,0795
bloques	0,141484	1	0,141484	0,04	0,8407
Error total	19,272	6	3,212		
Total (corr.)	1793,11	11			

7.2.3.2. Contenido en antocianos (TAC)

La determinación del TAC solo se realizó para los extractos obtenidos a partir de hollejo de uva tinta. Las hojas de mango y olivo no son fuente de este tipo de compuestos. En la siguiente tabla (tabla 6) se observa que en el extracto acuoso el TAC es mayor que en el etanólico.

Tabla 6: Contenido en antocianos totales (TAC)

Materia prima	Disolvente empleado	Contenido en antocianos totales (TAC) (mg AM eq/100 g Ext) \pm desv. Est
Hollejo de uva tinta	Agua	17.122 \pm 0.44
	Etanol	0.593 \pm 0.39

En la tabla 6 se observa claramente que un mayor TAC fueron recuperados empleando agua como disolvente. Los resultados obtenidos en cuanto al TAC, 17,122 y 0,593 mg AME/ 100 g extracto en el extracto acuoso y etanólico respectivamente, fueron menores a los obtenidos en un estudio (Otero-Pareja et al., 2015) en el que se emplea la técnica PLE con etanol en unas condiciones de 120 bar y 100 °C. El TAC obtenido en dicho estudio para la extracción del hollejo de la variedad Petit Verdot, la misma que se emplea en este TFG, fue de 113,8 mg cloruro de Malvina /g de extracto seco, aparentemente mayor a los resultados obtenidos en este TGF. La diferencia puede deberse principalmente a que el método empleado para determinar el TAC fue diferente, a que la temperatura empleada en el estudio fue mayor, aumentando la solubilidad de los antocianos y también pueden deberse al año y temporada de recolección de la materia.

7.2.4. Caracterización funcional de los extractos

7.2.4.1. Capacidad antioxidante

En la gráfica (figura 14 A) se muestran los resultados de capacidad antioxidante en términos de concentración eficiente (EC_{50}) e índice de actividad antioxidante (AAI) (figura 14 B). La mayor actividad antioxidante se atribuyó al extracto de hojas de mango, seguido del hollejo y las hojas de olivo. **El empleo de etanol hizo que la actividad antioxidante aumentara enormemente para las tres materias primas, sobresaliendo el caso del extracto de hojas de mango, en el que se pasó de un AAI de 4,401 en el extracto acuoso un AAI de 10,641 en el extracto etanólico.** Esta asociación del etanol con una mayor actividad antioxidante, puede estar relacionado con el mayor contenido polifenólico de los extractos etanólicos, dada la mayor selectividad del etanol en la extracción de estos compuestos (Chadha & Pal, 2018).

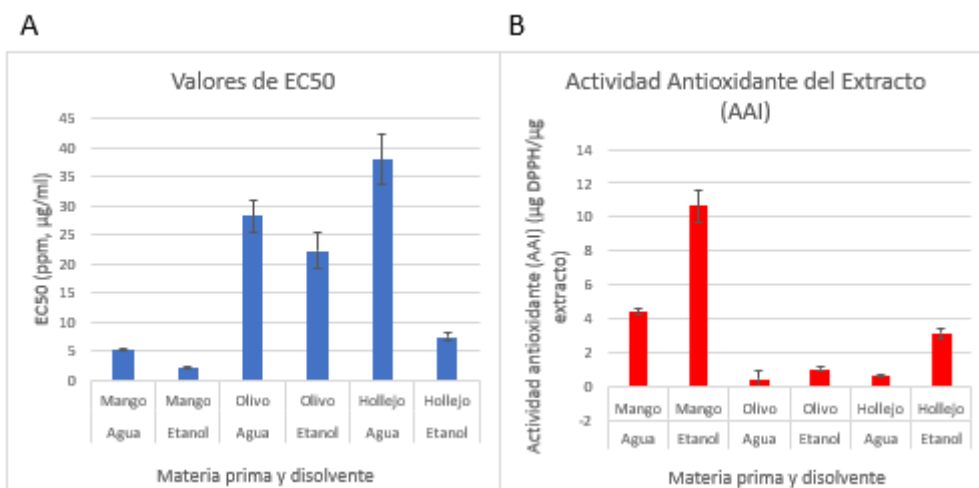


Figura 14: Poder antioxidante según la materia prima y el disolvente empleados. A) Diagrama de bloques del EC₅₀. B) Diagrama de bloques del AAI

En los extractos de **hojas de mango** se obtuvo un EC₅₀ de 2,180 ppm y un AAI de 10,641 µg DPPH/µg en el extracto etanólico y un EC₅₀ de 5,225 ppm y un AAI de 4,401 µg DPPH/µg en el extracto acuoso. Nuestros resultados fueron superiores a los obtenidos en un estudio previo (Fernández-Ponce et al., 2015) en el que se encontró que todos los extractos hidroalcohólicos de hojas de mango obtenidos por PLE tuvieron un AAI en el intervalo de 3,55–5,64 µg DPPH/µg extracto seco.

En cuanto a los extractos de **hojas de olivo**, se obtuvieron en los extractos acuosos y etanólicos unos EC₅₀ de 28,165 y 22,275 ppm, y unos AAI de 0,424 y 1,048 µg DPPH/µg, respectivamente. Estos valores fueron similares a los obtenidos en un estudio previo (Cejudo Bastante et al., 2017), en el que se obtuvo un AAI de 1,06 µg DPPH/µg y un EC₅₀ de 22,3 ppm. Cabe destacar que, en el caso del extracto de las hojas de olivo, el mayor contenido en polifenoles no coincidió con la mayor capacidad antioxidante. Esto puede deberse a que, aunque el contenido polifenólico sea menor en el extracto etanólico, los compuestos extraídos pudieron poseer una mayor actividad antioxidante, como es el caso de la oleuropeína o los productos de su degradación, tirosol e hidroxitirosol, que son antioxidantes más potentes aún que la oleuropeína (Goldsmith et al., 2018).

Por otro lado, el extracto etanólico de **hollejo de uva tinta** tuvo un EC₅₀ de 7,366 ± 0,710 ppm y un AAI de 3,152 ± 0,304 µg DPPH/µg; en cambio, la actividad antioxidante del extracto acuoso fue menor, obteniéndose un EC₅₀ de 37,938 ± 4,221 µg DPPH/µg. En la bibliografía (Otero-Pareja et al., 2015), se encuentran valores de EC₅₀ entre 7,5-9,2 ppm al emplear PLE con mezclas hidroalcohólicas, valores similares a los que obtuvimos en el extracto etanólico pero superiores a los obtenidos mediante el extracto acuoso. En este TFG, el mayor AAI para los extractos de hollejo de uva tinta no coincidió con el mayor TAC, pero sí con el mayor TPC.

El siguiente gráfico de Pareto (figura 15 A) muestra como todos los factores estudiados son significativos con respecto al EC₅₀. La materia prima (A) es la variable más significativa, seguida del disolvente empleado (B) y la interacción entre la materia prima y el disolvente (AB). Estos resultados se respaldan en la tabla ANOVA (tabla 7), en la que un P-valor menor que 0,05 muestra que la variable es significativa, la gráfica (figura 15 B) que afirma que el menor EC₅₀, y por tanto mayor actividad antioxidante, se obtuvo con el mango (raw material -1), seguido del hollejo (raw material 1) y el olivo (raw material 0).

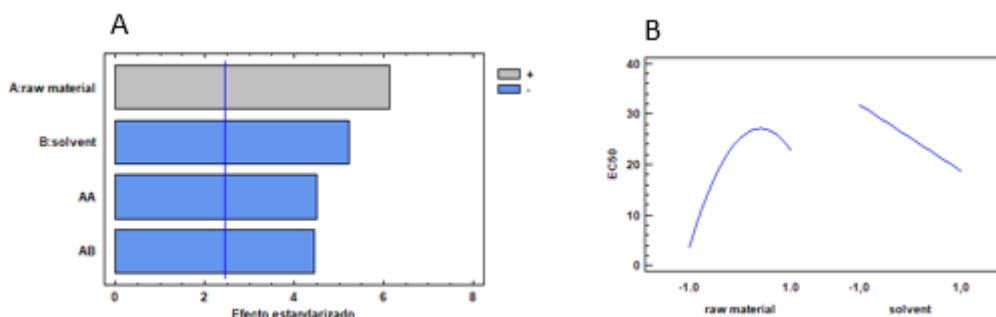


Figura 15: Análisis estadístico del EC₅₀. A) Diagrama de Pareto estabilizado del EC₅₀. B) Gráfica del análisis estadístico del EC₅₀.

Tabla 7: Tabla ANOVA del EC₅₀

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:raw material	717,037	1	717,037	37,59	0,0009
B:solvent	521,104	1	521,104	27,32	0,0020
AA	386,328	1	386,328	20,26	0,0041
AB	378,055	1	378,055	19,82	0,0043
bloques	1,5389	1	1,5389	0,08	0,7859
Error total	114,438	6	19,073		
Total (corr.)	2118,5	11			

La influencia que tienen los factores analizados sobre el AAI se muestra en el siguiente gráfico de Pareto (figura 16 A), observándose que la materia prima (A) es la variable más significativa, seguida del disolvente empleado (B). La influencia de la interacción entre la materia prima y el disolvente (AB) no es significativa. Estos resultados se respaldan en la tabla ANOVA (tabla 8), en la que un P-valor menor que 0,05 muestra que la variable es significativa, la gráfica (figura 16 B) que afirma que el mayor AAI se obtuvo con el mango (raw material -1), seguido del hollejo (raw material 1) y el olivo (raw material 0).

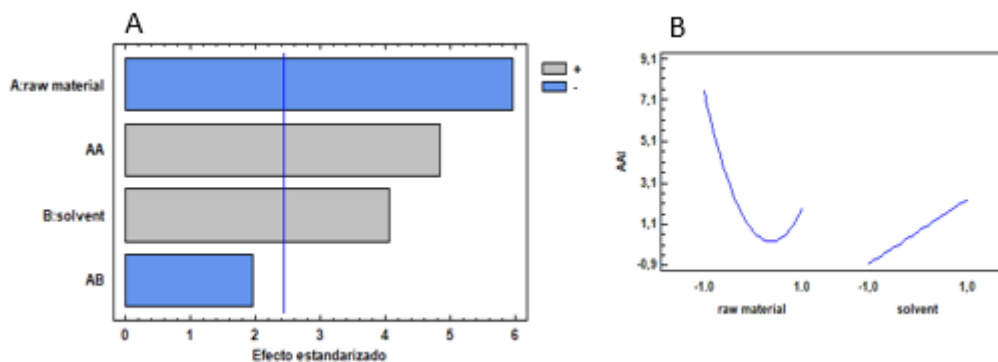


Figura 16: Análisis estadístico del AAI. A) Diagrama de Pareto estandarizado para el AAI. B) Gráfica del análisis estadístico del AAI:

Tabla 8: Tabla ANOVA del AAI

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:raw material	63,5881	1	63,5881	35,44	0,0010
B:solvent	29,4759	1	29,4759	16,43	0,0067
AA	41,9314	1	41,9314	23,37	0,0029
AB	6,85193	1	6,85193	3,82	0,0985
bloques	0,000886861	1	0,000886861	0,00	0,9830
Error total	10,7654	6	1,79424		
Total (corr.)	152,614	11			

Según los resultados obtenidos, las condiciones óptimas para conseguir el mayor poder antioxidante se encuentran relacionadas con el empleo de etanol como disolvente en la extracción PLE. Por otro lado, de entre todas las materias primas evaluadas, las hojas de mango han resultado proporcionar el mayor poder antioxidante. La actividad antioxidante de los extractos analizados constituyen una fuente de compuestos cabeza de serie para el desarrollo de novedosas terapias en la lucha contra una gran variedad de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Fraga et al., 2019). Sin embargo, en la aplicación de los extractos a cultivos celulares o modelos animales, un factor importante a tener en cuenta, es la toxicidad que el etanol puede producir (Vera et al., 2018). Por lo que, si en un futuro se llevan a cabo ensayos celulares con vistas a la aplicación biomédica, deberá realizarse un balance entre los beneficios atribuidos al uso del etanol, que proporciona mayor actividad antioxidante y la toxicidad de este. Así pues, el agua podría proveer un método más adecuado, aunque su actividad antioxidante sea menor.

7.2.5. Aplicaciones biomédicas

Los extractos acuosos y etanólicos de hojas de mango, hojas de olivo y hollejo de uva tinta estudiados en este TFG, tienen una amplia aplicación en el campo de la biomedicina, tanto en el área de las enfermedades cardiovasculares como en el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, autoinmunes e inflamatorias, a las que se hace referencia anteriormente en la introducción por su gran importancia. La revisión bibliográfica se centrará en el potencial biomédico en las enfermedades cardiovasculares, dado el gran impacto de las mismas y la necesidad de la sociedad actual por encontrar nuevas terapias, así como el gran contenido bibliográfico existente a este respecto.

7.2.5.1. Enfermedades cardíacas y aterosclerosis

Los polifenoles han sido relacionados con varios efectos beneficiosos contra las enfermedades cardiovasculares, ejerciendo influencia principalmente en la presión sanguínea, en la función endotelial, en el metabolismo lipídico, en los marcadores de estrés oxidativo, en la función plaquetaria y en los niveles de colesterol (Fraga et al., 2019).

a) Extractos de hojas de mango

Son numerosos los artículos que relacionan los extractos del mango con efectos anti-ateroscleróticos. Cabe destacar el papel de la mangiferina, con capacidad de reducción del colesterol, triglicéridos, y ácidos grasos libres en el plasma. Además, la mangiferina es capaz de disminuir el estrés oxidativo y el estrés en el retículo endoplásmico, restaurando la actividad mitocondrial (Imran et al., 2017). Un ejemplo de la capacidad cardioprotectora de la mangiferina, se encuentra en un estudio en el que la administración de mangiferina proporcionó protección a ratas frente al fármaco antineoplásico doxorubicina, que exhibe toxicidad cardíaca, reduciéndose las áreas necróticas en el tejido cardíaco (Imran et al., 2017).

Por otro lado, la mangiferina se ha probado también en la **enfermedad de Tangier**, que se caracteriza por la ausencia de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), que se encargan de realizar el transporte de colesterol reverso (RCT), es decir, de devolver el colesterol al hígado para que sea secretado, de esta forma, es un factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Ren et al., 2019). Las inyecciones de mangiferina en un modelo murino de esta enfermedad disminuyeron la formación de placas ateroscleróticas y redujeron los niveles plasmáticos de LDL, triglicéridos, y el colesterol total (Ren et al., 2019).

En estudios *in vitro*, la mangiferina mostró un efecto protector en células endoteliales de cordón umbilical humano, HUVEC, bajo estrés inducido por H₂O₂, afirmando su potencial de acción frente al **estrés oxidativo** (Luo et al., 2012). Además, existen estudios sobre la capacidad del extracto de mango de modular la **migración** de las células endoteliales, un paso esencial en la formación de nuevos vasos sanguíneos o angiogénesis (Daud et al., 2010). En este mismo estudio,

al analizar los compuestos bioactivos del extracto de manera aislada, se encontró que la quercetina inducía una disminución de la proliferación y migración celular al 50%, afirmando sus propiedades anti-angiogénicas (Daud et al., 2010). La mangiferina, al contrario, mostró un fuerte efecto pro-angiogénico, aumentando la proliferación y migración celular en un 600% (Daud et al., 2010).

En cuanto a la **quercetina**, previamente mencionada, se trata de un flavonoide presente en muchas frutas, como el mango, del cual se conoce que ejerce un efecto protector contra el estrés celular, especialmente contra el estrés mitocondrial (Criel, 2019). En un estudio en el que se creó en una línea celular intestinal estrés oxidativo causado por oligomicina, Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) y valonomicina, se encontró que la quercetina acumulada en las células mejoró el estado redox y la función mitocondrial, contrarrestando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), el agotamiento del ATP, los cambios en el potencial de la membrana mitocondrial y restaurando la respiración celular (Criel, 2019).

b) Extractos de hojas de olivo.

El consumo de aceite de oliva se encuentra relacionado con una reducción de los biomarcadores de inflamación y moleculares implicados en la arteriosclerosis, atribuyéndose su papel cardioprotector a su contenido polifenólico (Wongwarawipat et al., 2017). Por ello, existen gran multitud de estudios sobre el desarrollo de terapias contra las enfermedades cardiovasculares basadas en los extractos de diferentes partes de la vid y los polifenoles que contiene.

En un estudio en el que se trató la línea celular miocárdica H9c2 con cloruro de cobalto (CoCl₂) para producir hipoxia y con isoproterenol para inducir el infarto de miocardio en ratas Sprague Dawley, se probó el papel cardioprotector del extracto de hojas de olivo y su principal componente el **hidroxitirosol** (Wu et al., 2018). El estrés del retículo endoplasmático (ER) en los cardiomiocitos puede promover la apoptosis (Wu et al., 2018). La vía de la proteína homóloga C/EBP (vía CHOP) es la principal vía involucrada en el estrés del ER, y la proteína de choque térmico GRP78 es una de las proteínas más importante de dicha vía (Wu et al., 2018). Las proteínas CHOP y GRP78 son usadas como biomarcadores del estrés del ER y son expresadas en condiciones de hipoxia e isquemia (Wu et al., 2018). Los resultados del estudio *in vitro* mostraron que a una dosis de 40 mmol/L de hidroxitirosol revertía considerablemente la apoptosis inducida por CoCl₂, además de disminuir drásticamente la expresión de CHOP y GRP78 según niveles de ARN mensajero (ARNm) (Wu et al., 2018). En los estudios *in vivo* se encontró que la función cardíaca mejoró considerablemente al administrar extracto de hojas de olivo a las ratas, observándose de nuevo una disminución de la expresión de CHOP y GRP78. De este modo se confirmó que tanto el extracto de hojas de olivo como el hidroxitirosol exhiben una acción cardioprotectora al inhibir el estrés del ER (Wu et al., 2018).

Otros estudios se han centrado en comprobar el efecto que ejercen extractos ricos en **oleuropeína** e **hidroxitirosol** en ratas obesas, con riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (Fki et al., 2020). La administración oral durante 60 días a una dosis de 16 mg/kg de un extracto de hojas de olivo rico en hidroxitirosol (87.36% de todo el contenido polifenólico), a ratas con una dieta rica en grasas, resultó en una reducción del índice de masa corporal de un 16.66%, una disminución del contenido lipídico en plasma y en el hígado, una disminución de los niveles de glucosa e insulina, una reducción de los biomarcadores de estrés oxidativo en el hígado (TBARS, CAT, y SOD) (Fki et al., 2020). Otro dato de gran interés, es que la administración de los compuestos **oleuropeína**, **apigenina 7-glucósido** (Api7G) y **luteolina 7-glucósido** (Lut7G) provenientes de los extractos de hojas de olivo en células madre hematopoyéticas humanas (hHSC), subpoblación CD34⁺, induce la diferenciación hacia el linaje eritrocitario (Samet et al., 2015).

c) Extractos de hollejo de uva tinta

Las **antocianinas** existentes en los extractos de hollejo de uva tinta proporcionan protección frente a enfermedades cardiovasculares a través de la inhibición del proceso inflamatorio y de la disfunción endotelial, y de la disminución de la producción del óxido nítrico (NO) (Reis et al., 2016). En un artículo en el que se analizó el efecto de diferentes extractos de hollejo de uva tinta en ratas hipertensivas, estas fueron alimentadas con dosis de 21 mg/Kg/día durante 6 semanas, observándose que finalmente, la presión sanguínea sistólica disminuyó y se estabilizó (Rasines-Perea et al., 2018).

Por otro lado, diversos estudios evidencian que las antocianinas inhiben la migración celular y la angiogénesis, beneficiando a enfermedades relacionadas con el crecimiento anormal de los vasos sanguíneos, como el cáncer y la retinopatía diabética (Tsakiroglou et al., 2019).

Uno de los compuestos polifenólicos de interés que se encuentran en los extractos de hollejo es el **resveratrol** (Figueira & González, 2018). Este ha resultado prevenir la aterosclerosis mediante la inhibición de la oxidación de la LDL, la supresión de la agregación plaquetaria, la disminución del daño de las células endoteliales y de las lesiones ateroscleróticas, la represión de la producción de especies reactivas y la disminución de los niveles de colesterol (Figueira & González, 2018). En un estudio en el que se estudió el efecto del resveratrol sobre el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), cuyos niveles se encuentran aumentados en la aterosclerosis y en los infartos de miocardio, se evidenció el efecto antiinflamatorio y antiaterogénico del resveratrol, dada la disminución de los niveles de VEGF y de las lesiones ateroscleróticas en conejos con dietas enriquecidas en colesterol y suplementados con esta fitoalexina (Figueira & González, 2018).

8. CONCLUSIONES

Los extractos de hojas de mango, hojas de olivo y hollejo de uva tinta obtenidos por la técnica de extracción PLE aplicando como disolvente agua o etanol variaron en cuanto al rendimiento en el que se obtuvieron, contenido total en polifenoles y en antocianos (para los extractos de hollejo) así como en su capacidad antioxidante que se encuentra relacionada con el potencial biomédico de los mismos.

El mayor rendimiento se obtuvo al emplear hojas de olivo como materia prima, seguida de las hojas de mango y el hollejo de uva tinta. La capacidad antioxidante de los extractos de hojas de mango fue, con diferencia, la más potente, seguida de la capacidad antioxidante de los extractos del hollejo de uva tinta y hojas de olivo.

El análisis estadístico mostró que el disolvente empleado tuvo una influencia significativa en la actividad antioxidante, obteniéndose mejores resultados al emplear etanol, pero no en el rendimiento ni en el contenido total en polifenoles. El contenido en antocianos de los extractos de uva tinta fueron mayores al emplear agua como disolvente.

El potencial biomédico de estos extractos es muy amplio, destaca su aplicación en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, lo cual es posible gracias tanto a la capacidad antioxidante de los distintos componentes de los extractos como a otras propiedades, como la capacidad de regular el colesterol, propiedades antiinflamatorias o la disminución del estrés mitocondrial y endoplasmático.

9. PERSPECTIVAS DE FUTURO

En este estudio se ha realizado, primeramente, una parte experimental en la que se ha evaluado el empleo de diferentes disolventes, agua y etanol en la obtención de extractos de hojas de mango, hojas de olivo y hollejo de uva tinta, así como la influencia del disolvente en las propiedades químicas y biológicas. Sin embargo, la experimentación podría continuar, en este sentido, analizando los resultados obtenidos con mezclas hidroalcohólicas en diferentes proporciones, así como distintas partes de las plantas o incluso la extracción por otras técnicas como la extracción con fluidos supercríticos con empleo de co-disolvente, en distintas proporciones.

Debido al estado de alarma implantado por la pandemia actual, el estudio experimental sobre el efecto de los distintos extractos en la angiogénesis y proliferación celular de las células formadoras de colonias endoteliales de crecimiento tardío (ECFCs) con gran importancia en la reparación vascular y capacidad angiogénica, ha sido sustituido por una revisión bibliográfica sobre el potencial biomédico de los extractos, centrado en las enfermedades cardiovasculares. El estudio se podría ampliar realizando una revisión bibliográfica más exhaustiva sobre el potencial terapéutico de estos extractos en cáncer, enfermedades neurodegenerativas, autoinmunes e inflamación, por un lado, pero principalmente, la continuidad de este estudio podría basarse primordialmente en continuar con los experimentos que se tenían previstos inicialmente sobre el potencial terapéutico en la arteriosclerosis. En este sentido aún queda mucho que hacer, comenzando por los ensayos *in vitro* con líneas celulares e *in vivo* con modelos animales murinos que podrían hacer surgir novedosas terapias que tengan que pasar por todo un ensayo preclínico y clínico antes de implantarse en el sistema sanitario.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta Esquijorosa, J., Salomón Izquierdo, S., Sevilla Fernandez, I., & Nuevas Paz, L. (2016). Empleo del ultrasonido para la extracción de fracción apolar en hojas de *Mangifera indica* L. (árbol del mango) Use of ultrasound for extraction of the apolar fraction in leaves of *Mangifera indica* L. (mango tree). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(3), 261–271. <http://scielo.sld.cu>
- Balea, Ș. S., Pârvu, A. E., Pop, N., Marín, F. Z., & Pârvu, M. (2018). Polyphenolic Compounds, Antioxidant, and Cardioprotective Effects of Pomace Extracts from Fetească Neagră Cultivar. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 8194721. <https://doi.org/10.1155/2018/8194721>
- Benlarbi, M., Jemai, H., Hajri, K., Mbarek, S., Amri, E., Jebbari, M., Hammoun, I., Baccouche, B., Boudhrioua Mihoubi, N., Zemmal, A., Ben Chaouacha-Chekir, R., & Dhifi, W. (2020). Neuroprotective effects of oleuropein on retina photoreceptors cells primary culture and olive leaf extract and oleuropein inhibitory effects on aldose reductase in a diabetic model: Meriones shawi. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 0(0), 1–8. <https://doi.org/10.1080/13813455.2019.1708119>
- Brezoiu, A. M., Matei, C., Deaconu, M., Stanciuc, A. M., Trifan, A., Gaspar-Pintiliescu, A., & Berger, D. (2019). Polyphenols extract from grape pomace. Characterization and valorisation through encapsulation into mesoporous silica-type matrices. *Food and Chemical Toxicology*, 133(August), 110787. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110787>
- Castro-Vargas, H. I., Vivas, D. B., Barbosa, J. O., Medina, S. J. M., Gutiérrez, F. A., & Parada-Alfonso, F. (2019). Bioactive phenolic compounds from the agroindustrial waste of Colombian mango cultivars ‘sugar mango’ and ‘tommy atkins’—An alternative for their use and valorization. *Antioxidants*, 8(2), 1–19. <https://doi.org/10.3390/antiox8020041>
- Cejudo Bastante, C., Casas Cardoso, L., Mantell Serrano, C., & Martínez de la Ossa, E. J. (2017). Supercritical impregnation of food packaging films to provide antioxidant properties. *Journal of Supercritical Fluids*, 128(June), 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.05.034>
- Chadha, K. L., & Pal, R. N. (2018). *Mangifera indica*. *CRC Handbook of Flowering*, 5, 211–230. <https://doi.org/10.1201/9781351072571>
- Daud, N. H., Aung, C. S., Hewavitharana, A. K., Wilkinson, A. S., Pierson, J. T., Roberts-Thomson, S. J., Shaw, P. N., Monteith, G. R., Gidley, M. J., & Parat, M. O. (2010). Mango extracts and the mango component mangiferin promote endothelial cell migration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 5181–5186. <https://doi.org/10.1021/jf100249s>

- Ediriweera, M. K., Tennekoon, K. H., & Samarakoon, S. R. (2017). A Review on Ethnopharmacological Applications, Pharmacological Activities, and Bioactive Compounds of *Mangifera indica* (Mango). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6949835>
- Fernández-Ponce, M. T., López-Biedma, A., Sánchez-Quesada, C., Casas, L., Mantell, C., Gaforio, J. J., & Martínez De La Ossa, E. J. (2017). Selective antitumoural action of pressurized mango leaf extracts against minimally and highly invasive breast cancer. *Food and Function*, 8(10), 3610–3620. <https://doi.org/10.1039/c7fo00877e>
- Fernández-Ponce, M.T., Casas, L., Mantell, C., & De La Ossa, E. M. (2015). Use of high pressure techniques to produce *Mangifera indica* L. leaf extracts enriched in potent antioxidant phenolic compounds. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 29, 94–106. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.04.006>
- Fernández-Ponce, M.T., Parjikolaei, B. R., Lari, H. N., Casas, L., Mantell, C., & Martínez de la Ossa, E. J. (2016). Pilot-plant scale extraction of phenolic compounds from mango leaves using different green techniques: Kinetic and scale up study. *Chemical Engineering Journal*, 299, 420–430. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.04.046>
- Figueira, L., & González, J. C. (2018). Effect of resveratrol on seric vascular endothelial growth factor concentrations during atherosclerosis. *Clinica e Investigacion En Arteriosclerosis*, 30(5), 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2018.04.003>
- Fki, I., Sayadi, S., Mahmoudi, A., Daoued, I., Marrekchi, R., & Ghorbel, H. (2020). Comparative Study on Beneficial Effects of Hydroxytyrosol- And Oleuropein-Rich Olive Leaf Extracts on High-Fat Diet-Induced Lipid Metabolism Disturbance and Liver Injury in Rats. *BioMed Research International*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1315202>
- Fraga, C. G., Croft, K. D., Kennedy, D. O., & Tomás-Barberán, F. A. (2019). The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food and Function*, 10(2), 514–528. <https://doi.org/10.1039/c8fo01997e>
- Fuhrman, B., Volkova, N., Coleman, R., & Aviram, M. (2005). Grape Powder Polyphenols Attenuate Atherosclerosis Development in Apolipoprotein E Deficient (E0) Mice and Reduce Macrophage Atherogenicity. *The Journal of Nutrition*, 135(4), 722–728. <https://doi.org/10.1093/jn/135.4.722>
- Gill, J. G., Piskounova, E., & Morrison, S. J. (2016). Cancer, oxidative stress, and metastasis. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 81(1), 163–175. <https://doi.org/10.1101/sqb.2016.81.030791>

- Goldsmith, C. D., Bond, D. R., Jankowski, H., Weidenhofer, J., Stathopoulos, C. E., Roach, P. D., & Scarlett, C. J. (2018). The olive biophenols oleuropein and hydroxytyrosol selectively reduce proliferation, influence the cell cycle, and induce apoptosis in pancreatic cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(7), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms19071937>
- Gorzynik-Debicka, M., Przychodzen, P., Cappello, F., Kuban-Jankowska, A., Gammazza, A. M., Knap, N., Wozniak, M., & Gorska-Ponikowska, M. (2018). Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(3). <https://doi.org/10.3390/ijms19030686>
- Gu, C., Yang, M., Zhou, Z., Khan, A., Cao, J., & Cheng, G. (2019). Purification and characterization of four benzophenone derivatives from *Mangifera indica* L. leaves and their antioxidant, immunosuppressive and α -glucosidase inhibitory activities. *Journal of Functional Foods*, *52*(August 2018), 709–714. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.11.045>
- Haloui, E., Marzouk, B., Marzouk, Z., Bouraoui, A., & Fenina, N. (2011). Hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves: Potent anti-inflammatory and analgesic activities. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, *9*(3–4), 128–133.
- Hurtado, J. G. F. (2018). *Jorge Geovanny Figueroa Hurtado Doctor Internacional en Química por la Universidad de Granada*.
- Imran, M., Arshad, M. S., Butt, M. S., Kwon, J. H., Arshad, M. U., & Sultan, M. T. (2017). Mangiferin: a natural miracle bioactive compound against lifestyle related disorders. *Lipids in Health and Disease*, *16*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0449-y>
- Jara-Palacios, M. J., Hernanz, D., Cifuentes-Gomez, T., Escudero-Gilete, M. L., Heredia, F. J., & Spencer, J. P. E. (2015). Assessment of white grape pomace from winemaking as source of bioactive compounds, and its antiproliferative activity. *Food Chemistry*, *183*, 78–82. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.022>
- Kulkarni, V. M., & Rathod, V. K. (2018). Exploring the potential of *Mangifera indica* leaves extract versus mangiferin for therapeutic application. *Agriculture and Natural Resources*, *52*(2), 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.07.001>
- Liang, N., & Kitts, D. D. (2014). Antioxidant property of coffee components: Assessment of methods that define mechanism of action. *Molecules*, *19*(11), 19180–19208. <https://doi.org/10.3390/molecules191119180>
- Libby, P., Buring, J. E., Badimon, L., Hansson, G. K., Deanfield, J., Bittencourt, M. S., Tokgözoğlu, L., & Lewis, E. F. (2019). Atherosclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*,

5(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0106-z>

- Luo, F., Lv, Q., Zhao, Y., Hu, G., Huang, G., Zhang, J., Sun, C., Li, X., & Chen, K. (2012). Quantification and purification of mangiferin from Chinese mango (*Mangifera indica* L.) cultivars and its protective effect on human umbilical vein endothelial cells under H₂O₂-induced stress. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(9), 11260–11274. <https://doi.org/10.3390/ijms130911260>
- Messina, C. M., Troia, A., Arena, R., Manuguerra, S., Ioannou, T., Curcuraci, E., Renda, G., Hellio, C., & Santulli, A. (2019). Species-specific antioxidant power and bioactive properties of the extracts obtained from wild mediterranean *Calendula* Spp. (Asteraceae). *Applied Sciences (Switzerland)*, *9*(21), 1–13. <https://doi.org/10.3390/app9214627>
- Micheli, L., Mattoli, L., Maidecchi, A., Pacini, A., Ghelardini, C., & Di Cesare Mannelli, L. (2018). Effect of *Vitis vinifera* hydroalcoholic extract against oxaliplatin neurotoxicity: in vitro and in vivo evidence. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32691-w>
- Oreopoulou, A., Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2019). Extraction of Polyphenols From Aromatic and Medicinal Plants: An Overview of the Methods and the Effect of Extraction Parameters. *Polyphenols in Plants, January*, 243–259. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813768-0.00025-6>
- Otero-Pareja, M. J., Casas, L., Fernández-Ponce, M. T., Mantell, C., & De La Ossa, E. J. M. (2015). Green extraction of antioxidants from different varieties of red grape pomace. *Molecules*, *20*(6), 9686–9702. <https://doi.org/10.3390/molecules20069686>
- Palazzi, L., Leri, M., Cesaro, S., Stefani, M., Bucciantini, M., & Polverino de Laureto, P. (2020). Insight into the molecular mechanism underlying the inhibition of α -synuclein aggregation by hydroxytyrosol. *Biochemical Pharmacology*, *173*, 113722. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113722>
- Peixoto, C. M., Dias, M. I., Alves, M. J., Calhelha, R. C., Barros, L., Pinho, S. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. *Food Chemistry*, *253*(November 2017), 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.163>
- Putnik, P., Barba, F. J., Španić, I., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V., & Bursać Kovačević, D. (2017). Green extraction approach for the recovery of polyphenols from Croatian olive leaves (*Olea europea*). *Food and Bioproducts Processing*, *106*, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.08.004>

- Qabaha, K., Al-Rimawi, F., Qasem, A., & Naser, S. A. (2018). Oleuropein Is Responsible for the Major Anti-Inflammatory Effects of Olive Leaf Extract. *Journal of Medicinal Food*, 21(3), 302–305. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.0070>
- Raggi, P., Genest, J., Giles, J. T., Rayner, K. J., Dwivedi, G., Beanlands, R. S., & Gupta, M. (2018). Role of inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis and therapeutic interventions. *Atherosclerosis*, 276, 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.07.014>
- Rasines-Perea, Z., Ky, I., Cros, G., Crozier, A., & Teissedre, P.-L. (2018). Grape Pomace: Antioxidant Activity, Potential Effect Against Hypertension and Metabolites Characterization after Intake. *Diseases*, 6(3), 60. <https://doi.org/10.3390/diseases6030060>
- Reis, J. F., Monteiro, V. V. S., Souza Gomes, R., Carmo, M. M., Costa, G. V., Ribera, P. C., & Monteiro, M. C. (2016). Action mechanism and cardiovascular effect of anthocyanins: A systematic review of animal and human studies. *Journal of Translational Medicine*, 14(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1076-5>
- Ren, K., Li, H., Zhou, H. F., Liang, Y., Tong, M., Chen, L., Zheng, X. L., & Zhao, G. J. (2019). Mangiferin promotes macrophage cholesterol efflux and protects against atherosclerosis by augmenting the expression of ABCA1 and ABCG1. *Aging*, 11(23), 10992–11009. <https://doi.org/10.18632/aging.102498>
- Rodríguez Graña, T., Peña González, M., Gómez Trujillo, N., Santisteban Lozano, Y., & Hernández Tamayo, M. (2015). Estrés oxidativo: genética, dieta y desarrollo de enfermedades. *Correo Científico Médico*, 19(4), 690–705.
- Salvayre, R., Negre-Salvayre, A., & Camaré, C. (2016). Oxidative theory of atherosclerosis and antioxidants. *Biochimie*, 125, 281–296. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.12.014>
- Samet, I., Villareal, M. O., Motojima, H., Han, J., Sayadi, S., & Isoda, H. (2015). Olive leaf components apigenin 7-glucoside and luteolin 7-glucoside direct human hematopoietic stem cell differentiation towards erythroid lineage. *Differentiation*, 89(5), 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2015.07.001>
- Sanchez-Sanchez, J., Fernández-Ponce, M. T., Casas, L., Mantell, C., & de la Ossa, E. J. M. (2017). Impregnation of mango leaf extract into a polyester textile using supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 128(May), 208–217. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.05.033>
- Tsakiroglou, P., Vandenakker, N. E., Del Bo', C., Riso, P., & Klimis-Zacas, D. (2019). Role of berry anthocyanins and phenolic acids on cell migration and angiogenesis: An updated

overview. *Nutrients*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/nu11051075>

- Venkata Raju, N., Sukumar, K., Babul Reddy, G., Pankaj, P. K., Muralitharan, G., Annapareddy, S., Teja Sai, D., & Chintagunta, A. D. (2019). In-vitro Studies on Antitumour and Antimicrobial Activities of Methanolic Kernel Extract of *Mangifera indica* L. Cultivar Banganapalli. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 12(1), 357–362. <https://doi.org/10.13005/bpj/1648>
- Vera, L. M., Bello, C., Paredes, J. F., Carmona-Antoñanzas, G., & Sánchez-Vázquez, F. J. (2018). Ethanol toxicity differs depending on the time of day. *PLoS ONE*, 13(1), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190406>
- Wongwarawipat, T., Papageorgiou, N., Bertsias, D., Siasos, G., & Tousoulis, D. (2017). Olive Oil-related Anti-inflammatory Effects on Atherosclerosis: Potential Clinical Implications. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 18(1), 51–62. <https://doi.org/10.2174/1871530317666171116103618>
- Wu, L., Xu, Y., Yang, Z., & Feng, Q. (2018). Hydroxytyrosol and olive leaf extract exert cardioprotective effects by inhibiting GRP78 and CHOP expression. *Journal of Biomedical Research*, 32(5), 371–379. <https://doi.org/10.7555/JBR.32.20170111>
- Xynos, N., Papaefstathiou, G., Psychis, M., Argyropoulou, A., Aligiannis, N., & Skaltsounis, A. L. (2012). Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. *Journal of Supercritical Fluids*, 67, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.03.014>