

2° TALLER

BIOTECNOLOGÍA APLICADA A LA TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

27 Y 28 DE OCTUBRE 2022

LIBRO DE
RESÚMENES



UTN.BA
UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA NACIONAL
FACULTAD REGIONAL BUENOS AIRES



Agencia I+D+i

Agencia Nacional de Promoción
de la Investigación, el Desarrollo
Tecnológico y la Innovación

Subproductos de la Industria Vitivinícola de los Valles Calchaquíes como Fuente de Metabolitos Bioactivos

Pablo E. Tapia^a, Ana M. Silva^b, Cristina Delerue-Matos^b, Manuela Moreira^b, Francisca Rodrigues^b, María G. Ortega^c, María D. Santi^c, Carolina M. Viola^a, Romina Torres Carro^a, Elena Cartagena^a, Mario E. Arena^a, María R. Alberto^a*

^a Instituto de Biotecnología Farmacéutica y Alimentaria (INBIOFAL) CONICET–UNT. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán (UNT). Tucumán, Argentina.

^b REQUIMTE/LAQV, Polytechnic of Porto – School of Engineering. Portugal

^c Farmacognosia, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV), CONICET. Facultad de Ciencias Químicas. Córdoba, Argentina.

*maria.alberto@fbqf.unt.edu.ar

Palabras claves: polifenoles, antioxidantes, anti-tirosinasa, antitumorales, anti-biopelículas

Resumen

Uno de los principales desafíos de nuestra sociedad es el desarrollo de soluciones sostenibles para la gestión de los subproductos y desechos de agroindustrias. Numerosos estudios han demostrado que los subproductos del procesamiento de alimentos son fuentes ricas en fibras dietéticas, metabolitos secundarios, vitaminas, proteínas y péptidos y que pueden usarse como ingredientes alimenticios naturales o como nutracéuticos de bajo costo (Schieber, 2019).

La industria vitivinícola genera una gran cantidad de residuos orgánicos que resultan, altamente, contaminantes para el medio ambiente. Al ser el cultivo de la vid un cultivo estacional, la producción de vino se restringe a pocos meses, produciendo una gran cantidad de desechos con elevada carga de materia orgánica en poco tiempo. Argentina es el quinto productor mundial de vino y dependiendo de las condiciones de cosechas de las uvas, los residuos pueden alcanzar el 20% del volumen total. El orujo que constituye el 62% de los residuos generados en la bodega se produce durante el prensado de la uva y está constituido principalmente por piel y semillas de la baya. Por lo general, estos residuos son quemados, usados para la alimentación del ganado, como abono o desechados en ríos, a pesar de que contienen fitocompuestos atractivos para las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria (García-Lomillo et al., 2017).

Entre los fitoquímicos de uvas vinculados a efectos beneficiosos en salud, se incluyen: alcaloides, terpenos, saponinas, aceites volátiles y un amplio y diverso grupo de compuestos fenólicos (ác. fenólicos, flavonoides antocianos, flavonas, flavanoles, estilbenos, taninos, etc.) abundantes en la piel y semillas de las uvas (Ananga et al., 2017). Los flavonoides tienen efectos antivirales, anticancerígenos, antioxidantes, antimicrobiano, antiinflamatorio, anticolesterolemicos, antiangiogénicos y antitrombogénicos (Teixeira et al., 2014; Lingua et al., 2016; Ananga et al., 2017; Mattos et al., 2017). Otro beneficio es que, los compuestos fenólicos de vino que no son absorbidos en el intestino delgado llegan al colon donde son fermentados y desconjugados por enzimas bacterianas y son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias potencialmente patógenas, suprimir factores de virulencias como la neutralización de toxinas bacterianas, inhibir la formación de biofilm, y reducir de adherencia bacteriana (Vázquez-Armenta et al., 2018).

En los últimos años, los polifenoles han atraído un creciente interés por sus beneficios potenciales para la salud en la prevención de enfermedades cardíacas, hepáticas, neurodegenerativas, respiratorias, intestinales, síndrome metabólico y ciertos tipos de cáncer, por lo que se utilizan en diferentes productos alimenticios (como colorantes o antioxidantes alimenticios) y en aplicaciones farmacéuticas (como nutracéuticos) (Georgiev et al., 2014; Schieber, 2019). Sin embargo, el perfil polifenólico se ve fuertemente afectado tanto cuantitativa como cualitativamente por la variedad de uva, su grado de madurez, el origen geográfico, el clima, las condiciones del suelo del viñedo y técnicas de vinificación (Jiang & Zhang 2018; Giovinazzo et al., 2020).

Los Valles Calchaquíes ubicados en la región noroeste de Argentina tienen un clima templado con notables amplitudes térmicas y ocasionalmente presentan heladas tardías prolongadas en primavera. Los vinos blancos regionales corresponden al varietal Torrontés, que se ha convertido en la variedad emblemática de la región. Esta uva es óptima para producir vinos aromáticos y se adapta muy bien a toda la zona, convirtiéndose en la más cultivada de la región (Instituto Nacional De Vitivinicultura, 2021). Por otro lado, el vino tinto varietal Malbec (variedad de uva morada más explotada de Argentina) de los Valles Calchaquíes presenta particularidades diferentes a otras regiones vitivinícolas del país debido a las características del terruño descritas anteriormente. En vista de lo anterior, se decidió estudiar la composición química y propiedades antioxidante, antipatogénicas,

citotoxicidad, capacidad de inhibición enzimática y toxicidad aguda de orujos Torrontés y Malbec (*Vitis vinifera* L.) de los Valles Calchaquíes (Argentina).

Para este estudio el orujo de uva Torrontés se obtuvo de un proceso de elaboración de vino blanco, lo que significa que las uvas no fueron sometidas a fermentación etanólica, a diferencia de lo que ocurre en el proceso de elaboración de vino tinto, donde las uvas están totalmente involucradas en la fermentación como sería en el caso del orujo Malbec. El porcentaje de humedad en los orujos de Malbec y Torrontés fue de 73,6 y 74,4%, respectivamente. Después de secar y moler en harina, los orujos de uva se sometieron a extracción utilizando solventes GRAS (etanol/agua) y se llevaron a sequedad. Los rendimientos de extracción de principios solubles del orujo de Malbec y Torrontés fueron del 14 y 10%, respectivamente.

Se caracterización química (tamizaje fitoquímico) de los extractos de orujo ha permitido identificar varios metabolitos secundarios entre ellos polifenoles, flavonoides, antocianinas, cumarinas, taninos, quinonas y terpenos. Los esteroides se evidencian únicamente en el orujo de Torrontés, mientras que ninguno de los extractos presenta alcaloides y saponinas. El análisis cuantitativo de los metabolitos fenólicos presentes en los extractos revela que la variedad tinta Malbec presenta 6,7 veces más contenido de fenoles totales que el Torrontés. El contenido de compuestos fenólicos no flavonoides representa el 20% de los polifenoles presentes en el extracto de orujo de Malbec y el 40% en el orujo Torrontés. Respecto a los compuestos flavonoides totales el extracto Malbec presenta 7,5 veces más que el Torrontés. Esto se debe a que el contenido de flavanonas/dihidroflavonoles en el extracto de Malbec es 6,3 veces superior al del Torrontés y que en este último carece de antocianinas presentes en el orujo de vino tinto. Asimismo, el contenido de flavonas/flavonoles en el extracto Torrontés (0,1%) es muy inferior al Malbec (7,4%). El contenido de taninos en ambos extractos es significativo.

Mediante el análisis HPLC-DAD de los extractos se identifican 35 compuestos fenólicos individuales pertenecientes a la familia de los ácidos fenólicos, flavonoides y estilbenos. En el extracto Torrontés, los principales polifenoles son: ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico > ácido 4-O-cafeoilquínico > kaempferol-3-O-glucósido > isorhamnetin-3-O-glucósido > ácido caftarico > ácido sinápico > ácido gálico > ácido protocatequico > ácido trans-ferúlico > (+)-catequina. Mientras que en el extracto Malbec los principales compuestos fenólicos son: ácido protocatequico > (+)-catequina > ácido gálico > ácido 4-O-cafeoilquínico > ácido sinápico. El contenido de ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico en el extracto Torrontés es 5 veces superior al Malbec. Mientras que, el contenido de (+)-catequina y de los ácidos protocatequico y gálico es 8,8; 10 y 2,7 veces superior en el extracto Malbec.

Las especies reactivas, particularmente EROs (especies reactivas centradas en átomo de oxígeno) y ERNs (especies reactivas centradas en átomo de nitrógeno), juegan un papel importante en varios procesos fisiológicos, a saber, señalización celular, cascada inflamatoria y homeostasis. De esta forma, la evaluación de la capacidad depuradora de un extracto contra EROs y ERNs se vuelve más interesantes debido a sus funciones claves en los tejidos vivos. Con respecto las actividades antiradical catión ABTS ($Cl_{50}=7,79 \pm 0,17 \mu\text{g/ml}$), óxido nítrico ($Cl_{50}=414,19 \pm 5,79 \mu\text{g/ml}$), anión superóxido ($Cl_{50}=74,17 \pm 4,12 \mu\text{g/ml}$), e hipoclorito ($Cl_{50}=6,71 \pm 0,36 \mu\text{g/ml}$) ensayadas, el extracto Malbec muestra la mayor eficiencia de depuración. En el ensayo del poder quelante de hierro, el extracto Malbec es capaz de quelar el 42% del metal a $1000 \mu\text{g/ml}$. Asimismo el extracto Malbec ($CR_{50}= 10,22 \pm 0,16 \mu\text{g/ml}$) presenta poder reductor del Fe^{3+} superior al extracto Torrontés ($CR_{50}= 84,62 \pm 0,95 \mu\text{g/ml}$). En el ensayo de capacidad antioxidante *in vivo* que utiliza la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para estudiar la respuesta celular a EROs, el extracto de orujo Malbec ($12,5 \mu\text{g/ml}$) rescata el 24% de la levadura del estrés oxidativo inducido por H_2O_2 . En síntesis, el orujo Malbec muestra buena actividad depuradora de ROS y RNS, lo que puede estar relacionado con su mayor contenido fenólico respecto al orujo Torrontés, particularmente catequina, ácido gálico y ácido protocatequico cuyo potencial depurativo de radicales libres ha sido ampliamente demostrado.

En diferentes bioensayos con dos líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal humano se analiza la citotoxicidad de estos extractos. El orujo Torrontés (1 mg/ml) afecta la viabilidad del 70 y 50% de las células HT29-MTX y Caco-2, respectivamente. Mientras que el orujo Malbec a la misma concentración reduce el 20% de la actividad metabólica de las células Caco-2.

La tirosinasa, también conocida como polifenol oxidasa, es la enzima clave en la producción de melanina. Inhibidores de esta enzima tienen gran interés en productos médicos y cosméticos ya que pueden usarse para prevenir o tratar los problemas de hiperpigmentación. El extracto de orujo Malbec inhibe la actividad de esta enzima ($IC_{50}= 88,8 \pm 2,36 \mu\text{g/ml}$). Sin embargo, ningún extracto inhibió la enzima xantina oxidasa que desempeña un papel clave en la hiperuricemia.

Por otro lado, los extractos de orujo presentan actividad antipatogénica ya que inhiben la producción de la biopelícula bacteriana, principal causa de contaminación en las industrias de alimentos; y la actividad metabólica de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* en el entorno del biofilm. Existe una correlación positiva entre la actividad antibiofilm y antioxidante y el contenido de polifenoles de los extractos más activos (Viola et al., 2018, 2021). La atenuación de la biopelícula y de la motilidad *swarming* y *swimming* responsable del desplazamiento de *P. aeruginosa* por acción del extracto de Torrontés, está controlada por *quorum sensing* (Viola et al., 2020).

El ensayo de toxicidad aguda con *Artemia salina* es un método *in vivo* simple y rápido que permite evaluar la citotoxicidad de una muestra y se correlaciona bien con los ensayos *in vivo*. Las concentraciones biológicamente activas de los extractos de orujo no son letales para el crustáceo sugiriendo su uso seguro.

Los contenidos de metabolitos fenólicos y actividad biológica encontrados en los orujos de los Valles Calchaquíes les confieren propiedades promotoras de la salud humana, con la correspondiente revalorización de los residuos de las bodegas regionales.

Referencias:

- Ananga, A., Obuya, J., Ochieng, J., & Tsolova, V. (2017). Grape seed nutraceuticals for disease prevention: current status and future prospects. *Phenolic Compounds–Biological Activity*, 119-137.
- García-Lomillo, J. González-San José, (2017). Applications of wine pomace in the food industry: approaches and functions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16.
- Georgiev, V., Ananga, A., & Tsolova, V. (2014). Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients*, 6(1), 391-415.
- Giovinazzo, G., Gerardi, C., Uberti-Foppa, C., & Lopalco, L. (2020). Can Natural Polyphenols Help in Reducing Cytokine Storm in COVID-19 Patients? *Molecules*, 25(24), 5888.
- Instituto Nacional de Vitivinicultura (2021). Informe variedad Torrontés. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2018/10/01-torrontes_2020.pdf
- Jiang, B., & Zhang, Z. W. (2018). Free Radical-scavenging Activity and Anthocyanin Profiles of Cabernet Sauvignon and Merlot Wines from Four Wine Grapegrowing Regions in China. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 40(1).
- Lingua, M. S., Fabani, M. P., Wunderlin, D. A., & Baroni, M. V. (2016). In vivo antioxidant activity of grape, pomace and wine from three red varieties grown in Argentina: Its relationship to phenolic profile. *Journal of Functional Foods*, 20, 332-345.
- Mattos, G. N., Tonon, R. V., Furtado, A. A., & Cabral, L. M. (2017). Grape by-product extracts against microbial proliferation and lipid oxidation: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(4), 1055-1064.
- Schieber, A. (2019) By-Products of Plant Food Processing as a Source of Valuable Compounds. *Reference Module in Food Science*.
- Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D. A., & Garcia-Viguera, C. (2014). Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(9), 15638-15678.
- Vázquez-Armenta, Bernal-Mercado, Pacheco-Ordaz, González-Aguilar, Ayala-Zavala (2018). Winery and Grape Juice Extraction By-Products. Cap 6, 157-181. In *Plant Food By-Products: Industrial Relevance for Food Additives and Nutraceuticals*.
- Viola, C. M., Alberto, M. R., Cartagena, E., & Arena, M. E. (2020). Inhibición de motilidad y Quorum sensing bacteriano por desechos de vinificación. *Nereis: Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación*, (12), 151-166.
- Viola, C. M., Cartagena, E., & Arena, M. E. (2021). Desechos de vinificación como inhibidores de biopelículas de *Staphylococcus aureus*. *Nereis. Interdisciplinary Ibero-American Journal of Methods, Modelling and Simulation.*, 13, 135–146.
- Viola, C. M., Torres-Carro, R., Cartagena, E., Isla, M. I., Alberto, M. R., & Arena, M. E. (2018). Effect of Wine Wastes Extracts on the Viability and Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* Strains. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 1–9.