

METABOLITOS SECUNDARIOS EN ORUJOS DE UVAS TINTAS (*Vitis vinifera* L.) CV. MALBEC Y SU APLICACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA.

LIC. ANDREA ANTONIOLLI

DIRECTOR: DR. RUBÉN BOTTINI

CODIRECTORA: DRA. PATRICIA PICCOLI

INSTITUTO DE BIOLOGÍA AGRÍCOLA DE MENDOZA,
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS,
CONICET-UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO,
CHACRAS DE CORIA, ARGENTINA



INTRODUCCIÓN



METABOLITOS
PRIMARIOS

COMPUESTOS
ORIGINADOS
VINIFICACIÓN

METABOLITOS
SECUNDARIOS

POLIFENOLES

No flavonoides:

Ácidos benzoicos (C_6-C_1)

Ácidos cinámicos (C_6-C_3)

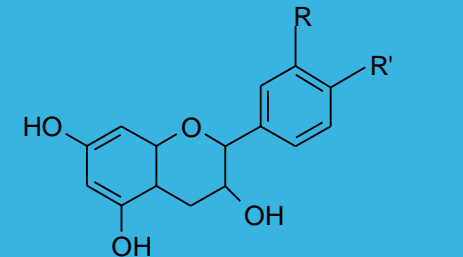
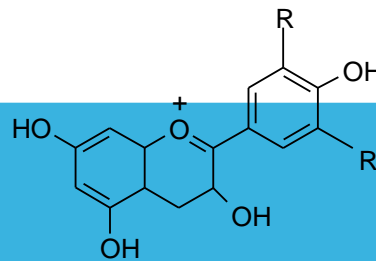
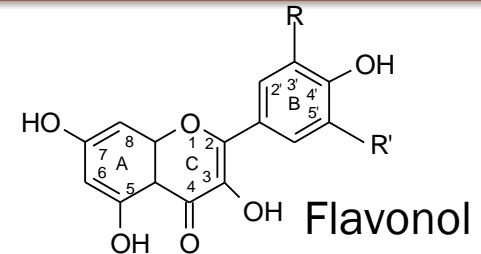
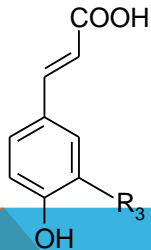
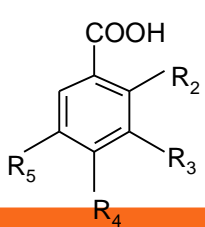
Estilbenos ($C_6-C_2-C_6$)

Flavonoides ($C_6-C_3-C_6$):

Flavonoles

Antocianos

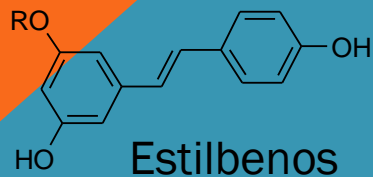
Flavan-3-oles.



Ácidos Fenólicos Ácidos Cinámicos

Antocianidina

Flavan-3-ol



Estilbenos

OBJETIVO GENERAL

Extraer compuestos del metabolismo secundario presentes en el orujo de uva de cv. Malbec, caracterizarlos y evaluar su potencial aplicación en biotecnología.

HIPÓTESIS GENERAL

El extracto de orujo de cv. Malbec contiene polifenoles, terpenos y otros metabolitos que poseen efecto antioxidante y antiplaquetario que justifican su aplicación en biotecnología.

Hipótesis 1

El orujo proveniente de la vinificación de uvas cv. Malbec posee polifenoles y terpenos de interés desde el punto de vista nutracéutico y funcional.

OBJETIVOS

- **Extraer** mediante solubilización en mezcla hidro-alcohólica y hexano, polifenoles y otros metabolitos secundarios a partir de residuos de la vinificación de uvas cv. Malbec.
- Analizar por medio de métodos físico-químicos el **perfil de metabolitos secundarios** de residuos de la vinificación, identificando y separando las diversas especies químicas.
- Estudiar mediante ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) la **capacidad antioxidante** de extractos crudos y de los componentes principales de naturaleza polifenólica y terpénica.

Hipótesis 2

Los distintos polifenoles y terpenos del orujo poseen acción diferencial sobre la actividad antiplaquetaria en sangre humana y como protectores cardiovasculares en ratas con síndrome metabólico.

OBJETIVOS

- Estudiar el efecto del orujo y de extractos crudos sobre la actividad antiplaquetaria en sangre humana, como protección cardiovascular en ratas con **síndrome metabólico**.



ORUJO

1:5 (p/v)

Moler

SOLUCIÓN
HIDROALCOHÓLICA

Etanol-agua 1+1



Extracción
sólido-líquido

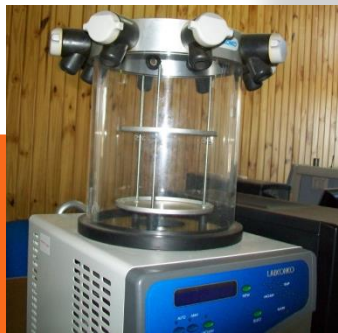
Filtrar

Concentrar



Extracto concentrado

Liofilizar



**Extracto
liofilizado (GPE)**



Resuspender

Análisis



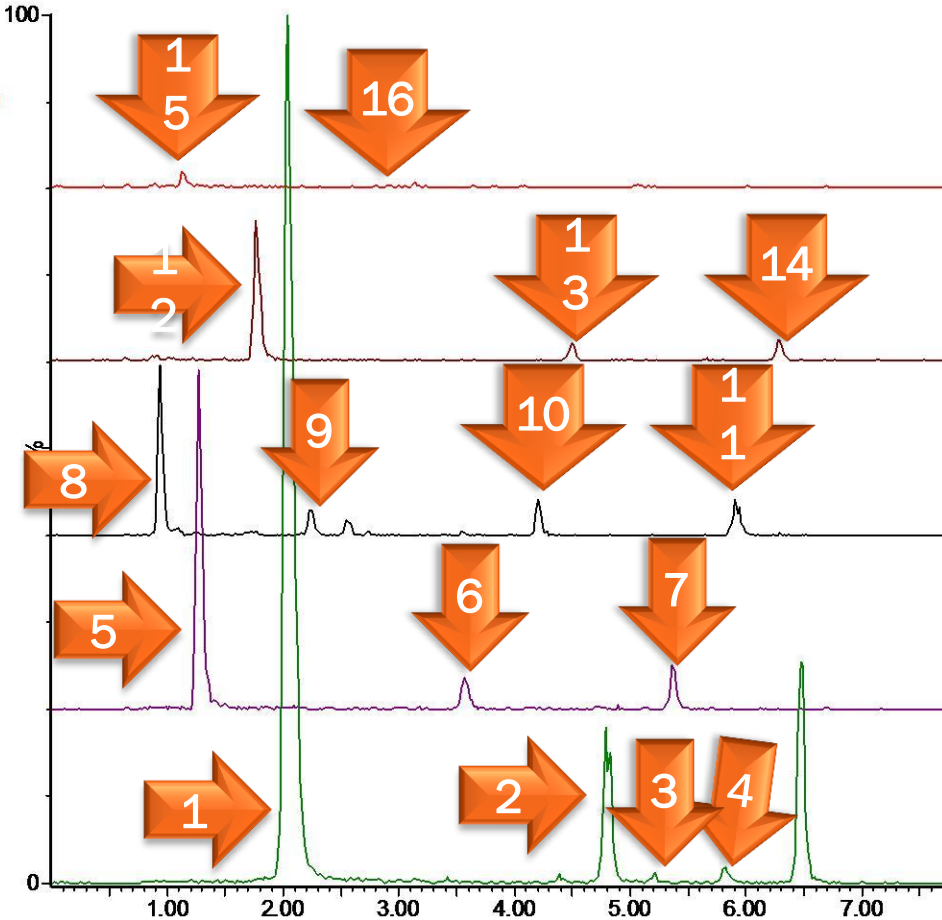
Pruebas
biológicas



Rendimientos de extracción, contenido de polifenoles totales (TPC) y actividad antioxidante en GPE cv. Malbec

Rendimiento total (g GPE 100 g ⁻¹ GP ms)	16,1 ± 3,1
TPC GAE FC (mg GAE g ⁻¹ GPE)	196,2 ± 22,7
TPC GAE 280 (mg GAE g ⁻¹ GPE)	165,7 ± 30,2
Rendimiento en polifenoles (mg GAE g ⁻¹ GP ms)	31,6 ± 7,0
ORAC (μmol TE g ⁻¹ GPE)	2756,0 ± 109,0

Perfil de antocianos UPLC-MS

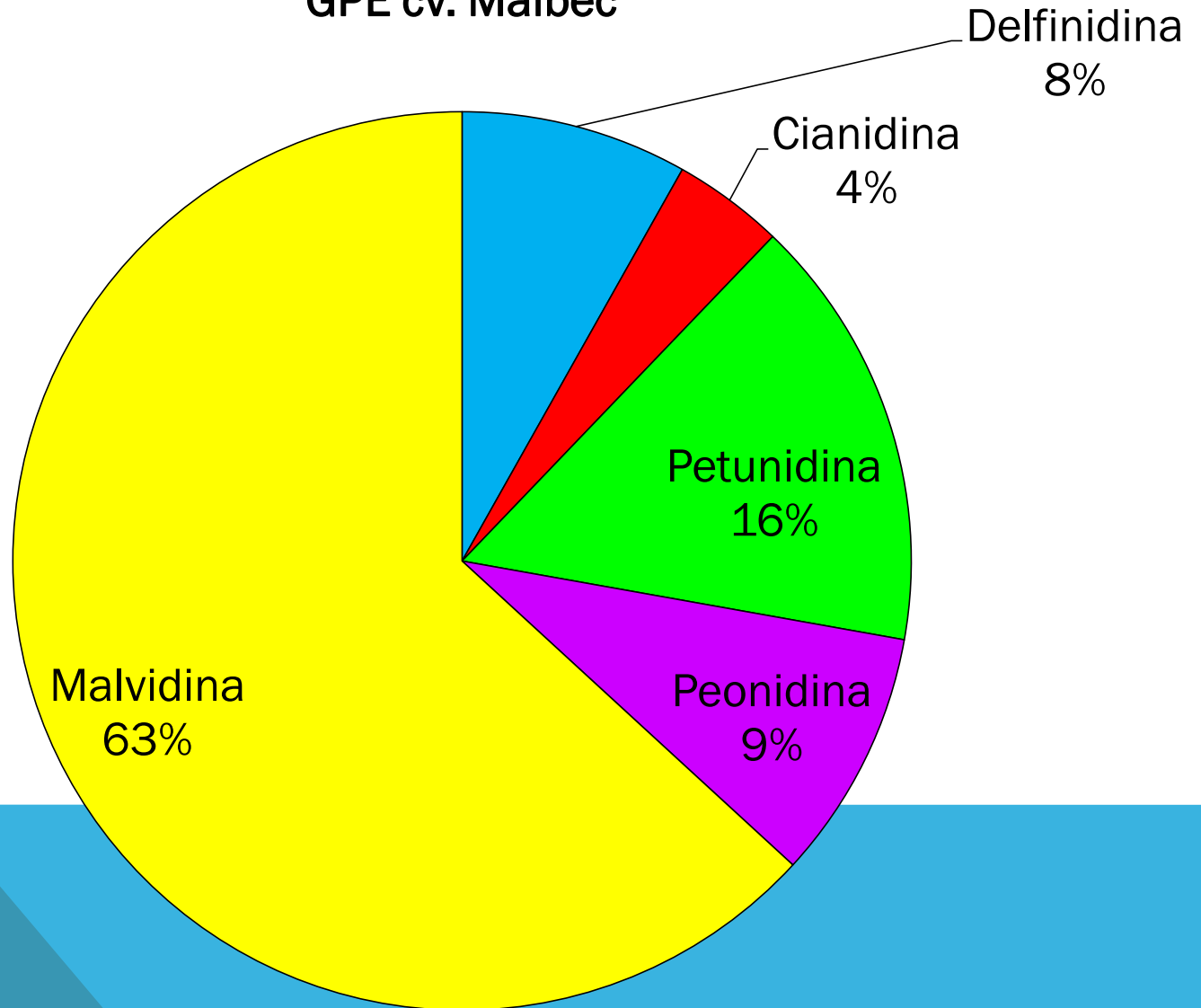


Ref.	Rt	[M ⁺]	Antocianina identificada
1	2.039	493	Malvidina-3-glucósido
2	4.786	535	Malvidina-3-(6''-acetil)glucósido
3	5.206	655	Malvidina diglucosido
4	5.818	639	Malvidina 3-(6''-p-cumarilglucosido)
5	1.286	479	Petunidina-3glucósido
6	3.561	521	Petunidina 3-(6''-acetilglucósido)
7	5.363	625	Petunidina 3-(6''-p-cumarilglucósido)
8	0.936	465	Delfinidina 3 glucósido
9	2.249	507	Delfinidina 3 -(6''-acetylglucósido)
10	4.208	611	Delfinidina cumaril glucósido
11	5.905	659	Delfinidina galloyl acetil glucósido
12	1.776	463	Peonidina-3-glucósido
13	4.488	505	Peonidina 3-(6''-acetilglucósido)
14	6.290	609	Peonidina 3-(6''-p-cumarilglucósido)
15	1.146	449	Cianidina 3-glucósido
16	3.141	517	Vitisin B

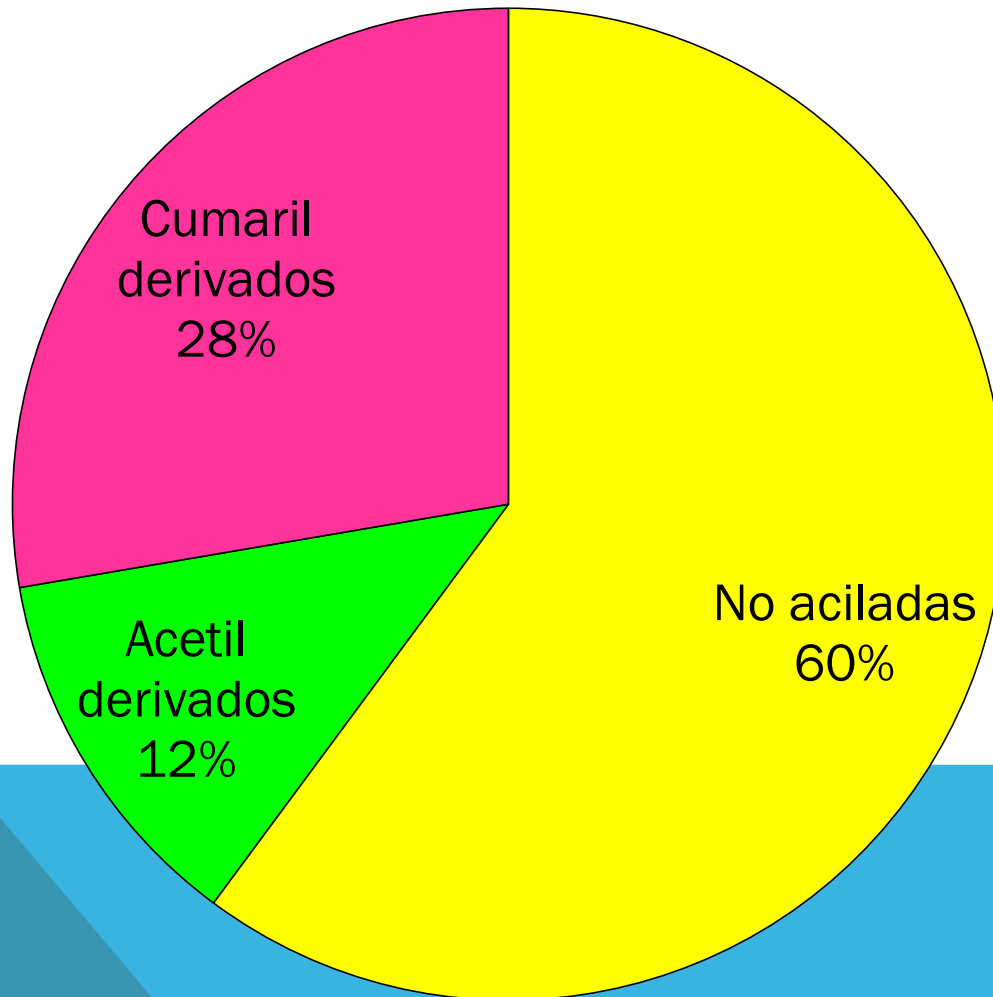
Composición de antocianinas en GPE cv. Malbec

Antocianinas	μg g ⁻¹ GPE liofilizado	
	Media	SD
Delfinidina-3-glucósido	4580,55 ±	8,35
Cianidina-3-glucósido	869,96 ±	26,23
Petunidina-3-glucósido	6880,47 ±	107,58
Peonidina-3-glucósido	2460,04 ±	54,87
Malvidina-3-glucósido	26657,97 ±	193,22
Total glucosiladas	41448,98	
Delfinidina-3-(6"-acetil)glucósido	1043,14 ±	8,05
Petunidina-3-(6"-acetil)glucósido	1423,81 ±	41,27
Peonidina-3-(6"-acetil)glucósido	1902,37 ±	28,90
Malvidina-3-(6"-acetil)glucósido	4021,19 ±	101,53
Total acetiladas	8390,51	
Cianidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido	1885,76 ±	6,19
Petunidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido	2481,19 ±	62,63
Peonidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido	1853,73 ±	84,07
Malvidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido	12863,86 ±	384,28
Total cumariladas	19084,53	
Total antocianinas	68924,03	

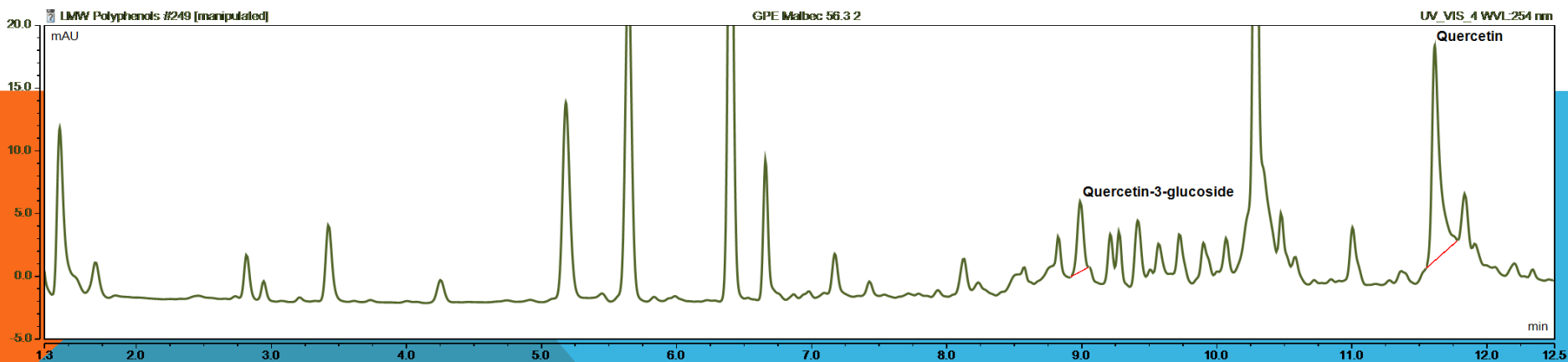
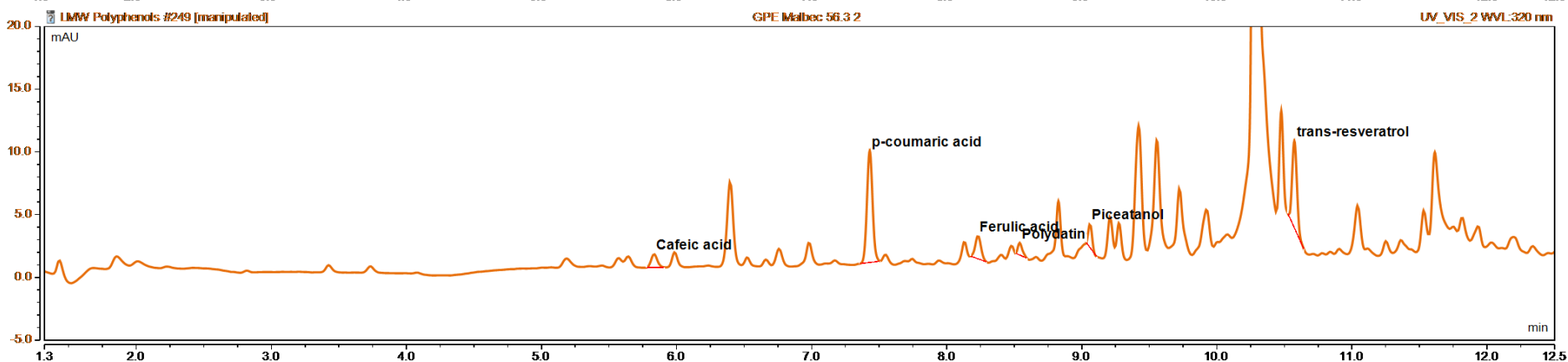
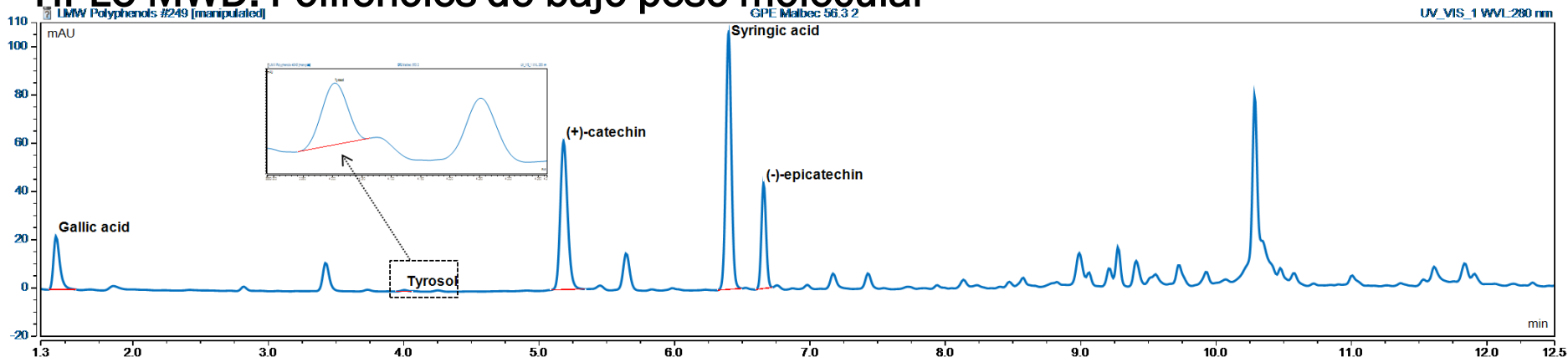
Distribución de antocianinas por tipo de antocianidina en GPE cv. Malbec



Distribución de antocianinas por el tipo de sustitución en GPE cv. Malbec



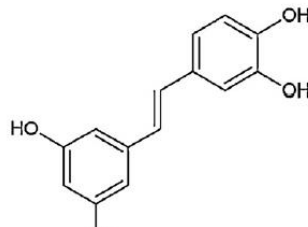
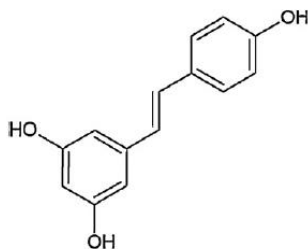
HPLC-MWD: Polifenoles de bajo peso molecular



Niveles de polifenoles de bajo peso molecular en GPE cv. Malbec

RESULTADOS

compuesto	µg g ⁻¹ GPE liofilizado		compuesto	µg g ⁻¹ GPE liofilizado	
	Media	DE		Media	DE
Ácidos hidroxibenzoicos			Flavanoles		
Ácido gálico	252,81 ±	18,52	(+)-catequina	3387,47 ±	374,74
Ácido sirínico	1731,69 ±	156,25	(-)-epicatequina	1763,37 ±	221,8
total ácidos hidroxibenzoicos	1984,50		total flavanoles	5150,84	
Ácidos hidroxicinámicos			Flavonoles		
Ácido caftárico			Quercetin-3-glucósido	112,16 ±	12,11
Ácido cafeico	15,99 ±	2,59	Quercetina	557,34 ±	83,85
Ácido p-cumárico	64,56 ±	5,25	total flavonoles	669,5	
Ácido ferúlico	24,06 ±	1,13	Otros compuestos		
total ácidos hidroxicinámicos	104,61		OH-Tirosol	5,09 ±	0,62
Estilbenos			Tirosol	33,98 ±	2,69
Polidatin	12,25 ±	2,73	total otros compuestos	39,07	
<u>Piceatanol</u>	38,79 ±	5,42	Total compuestos fenólicos	8035,53	
<u>trans-resveratrol</u>	35,97 ±	4,93			
total estilbenos	87,01				





Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec



Andrea Antonioli, Ariel R. Fontana*, Patricia Piccoli, Rubén Bottini

Laboratorio de Bioquímica Vegetal, Instituto de Biología Agrícola de Mendoza (IBAM), Facultad de Ciencias Agrarias, CONICET – Universidad Nacional de Cuyo, Almirante Brown 500, M5528AHH Chacras de Coria, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 October 2014

Received in revised form 16 January 2015

Accepted 17 January 2015

Available online 22 January 2015

Keywords:

Grape pomace

Malbec

Polyphenols

ABSTRACT

Low molecular weight polyphenols (LMW-PPs) and anthocyanins, along with the antioxidant capacity, were assessed in grape pomace extract (GPE) of red grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec. Twenty-six phenolics (13 LMW-PPs and 13 anthocyanins) were characterized and quantified by HPLC-MWD and UPLC-ESI-MS. The maximum concentrations of LMW-PPs corresponded to the flavanols (+)-catechin and (–)-epicatechin, whereas malvidin-3-glucoside was the most abundant anthocyanin. Piceatannol, a stilbene analogue to resveratrol with higher antioxidant activity, was firstly identified and quantified in GPE of the cv. Malbec. The antioxidant activity for Malbec GPE determined by oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay was 2756 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ GPE. Therefore, the data reported sustain the use of winemaking by-products as a cheap source of phenolic compounds suitable for biotechnological applications, as a strategy for sustainable oenology.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Grape is the world's largest fruit crop with an annual production of more than 67 million tons of berries. About 80% of the worldwide grape production is used in winemaking (Fontana, Antonioli, & Bottini, 2013; Kammerer, Claus, Carle, & Schieber, 2004), and thus this industry is relevant for several countries. Argentina has 228,575 ha of vineyards which is around 3% of the global grape area. Malbec is the main cv. produced in Argentina representing 31% of red grape area, and is considered the emblem-

of tons of left-overs that represent an ecological and economical waste management issue (Fontana et al., 2013).

The recovery of phenolics from GP has attracted increasing attention in the past years, and industries are finding high value and sustainable alternative to their residues. This is because GP is a potential source of phytochemicals that may be recovered as functional compounds for the pharmaceutical, cosmetic, and food industries, and used also, as biopesticides (Fontana et al., 2013). Thus, the phenolic and antioxidant characterization of the winemaking industry by-products is the first step to promote such



ORUJO



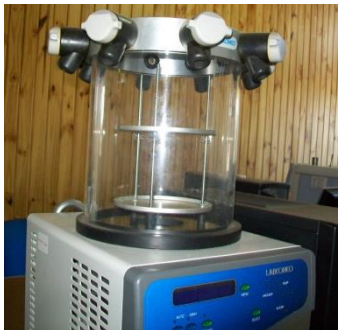
Liofilizar



Moler



**Orujo
liofilizado (GP)**



Extracción y Análisis
Fisicoquímicos



Pruebas
biológicas

Contenido de polifenoles totales, fibra dietaria y actividad antioxidante en GP cv. Malbec

Fibra Dietaria Total %	53,49 ± 0,57
Fibra dietaria soluble %	2,67 ± 0,03
Fibra dietaria insoluble %	50,82 ± 0,54
Polifenoles totales (mg GAE g ⁻¹ GP)	41,60 ± 2,10
ORAC (μmol TE g ⁻¹ GP)	258,10 ± 31,94

RESULTADOS



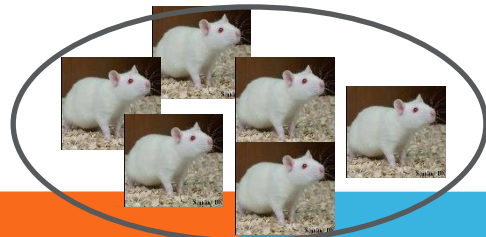
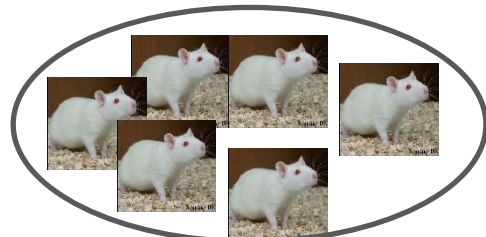
Niveles de compuestos fenólicos de bajo peso molecular en GP cv. Malbec

Analito	$\mu\text{g g}^{-1}$ GP
Ácido gálico	$62,8 \pm 5,7$
(+)-catequina	$450,8 \pm 37,7$
(-)-epicatequina	$598,8 \pm 54,5$
Ácido cafeico	$184,2 \pm 18,4$
Ácido siríngico	$125,3 \pm 13,9$
Ácido p-cumarico	$55,2 \pm 5,9$
Ácido ferúlico	$11,6 \pm 1,2$
<i>trans</i> -resveratrol	$55,9 \pm 5,1$
Quercetina	$604,8 \pm 74,4$



SÍNDROME METABÓLICO (MS)

METODOLOGÍA



Alimento balanceado

20%grasa y 20% fructosa

1: Control

2: DAGyF

3: DAGyF +
GPE1

4: DAGyF +
GPE2

5: DAGyF + GP

Extracto
 $0,1g\ kg^{-1}\ día^{-1}$

Extracto
 $0,3g\ kg^{-1}\ día^{-1}$

Orujo
 $1g\ kg^{-1}\ día^{-1}$

Suministrado por 6 semanas

RESULTADOS

Parámetros metabólicos en ratas

Parámetro	Control	DAGyF	DAGyF + GPE1	DAGyF + GPE2	DAGyF + GP
Ingesta de comida (g/d)	23,5 ± 1,1	23,1 ± 0,6	22,7 ± 0,5	20,6 ± 0,5	20,3 ± 0,8
Ingesta de agua (mL/d)	40,3 ± 2,1	35,3 ± 0,9	33,7 ± 0,9	33,7 ± 0,9	34,1 ± 1,6
PAS mmHg	107 ± 3 ^a	135 ± 5 ^b	124 ± 3 ^{a,b}	121 ± 3 ^a	119 ± 4 ^a
Peso corporal (g)	320 ± 7 ^a	383 ± 13 ^b	368 ± 7 ^b	348 ± 9 ^{a,b}	354 ± 14 ^{a,b}
Glucemia (mg/L)	927 ± 47	882 ± 33	905 ± 26	887 ± 25	958 ± 16
Triglicéridos (mg/L)	1200 ± 40 ^a	1540 ± 50 ^c	1430 ± 10 ^{b,c}	1370 ± 40 ^{a,b}	1320 ± 80 ^{a,b}
HDL (mg/L)	304 ± 26 ^{a,b}	233 ± 16 ^b	324 ± 24 ^{a,b}	363 ± 17 ^a	337 ± 26 ^a



CONCLUSIONES

- Se demuestra la capacidad antioxidante y se determina la composición fenólica del orujo de cv. Malbec.
- Se identifica por primera vez el estilbeno piceatanol en un producto proveniente de uva cv. Malbec.
- Estos resultados refuerzan la utilización de los extractos de orujo y del orujo de uva cv. Malbec como nutraceuticos en la industria alimenticia o farmacéutica.
- El consumo de alimentos enriquecidos con GP o GPE puede ser útil en la prevención o atenuación del MS o enfermedades asociadas.

EN DESARROLLO

- Extraer mediante solubilización en mezcla hidro-alcohólica y **hexano**, polifenoles y **otros metabolitos secundarios** a partir de residuos de la vinificación de uvas cv. Malbec.
- Analizar por medio de métodos físico-químicos el perfil de metabolitos secundarios de residuos de la vinificación, identificando y separando las diversas especies químicas.
- Estudiar mediante ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) la capacidad antioxidante de extractos crudos y de los **componentes principales de naturaleza polifenólica y terpénica**.

GRACIAS POR SU
ATENCIÓN

