



INFORME PERIODO: 2011 - 2012

1. APELLIDO: Tournier

Nombre(s): **Horacio Alfio**

Título(s): Lic Farmacia y Bioquímica Dirección Electrónica: horaciotournier@gmail.com

2. OTROS DATOS

INGRESO: Categoría: Adjunto

Mes: enero

Año: 1980

ACTUAL: Categoría: Principal

Mes: agosto

Año: 1991

3. PROYECTOS DE INVESTIGACION EN LOS CUALES COLABORA

A) Evaluación de las propiedades antioxidantes, citotóxicas y farmacológicas de productos naturales de uso alimentario y medicinal.

A1) Definición de parámetros de medida de la actividad antioxidante total (CAT) de vinos argentinos.

A2) Determinación de la actividad antiinflamatoria de un extracto acuoso de Yerba mate.

4. DIRECTOR

Apellido y Nombre (s): Buschiazzo, Héctor O.

Cargo Institución: Profesor Extraordinario Consulto. Fac. Cs. Médicas UNLP.

Dirección: Calles 60 y 120

S/Nº

Ciudad: La Plata

C. P.: 1900 Prov.: Bs. As. Tel.: 421 69 32 Dirección Electrónica:

5. LUGAR DE TRABAJO

Institución: Universidad Nacional de La Plata

Dependencia: Cátedra de Farmacología Básica. Facultad de Ciencias Médicas

Dirección: Calles 60 y 120

Ciudad: La Plata

C. P.: 1900

Prov.: Bs. As.

Tel: 421 6932

6. INSTITUCION DONDE DESARROLLA TAREAS DOCENTES U OTRAS

Nombre: Universidad Nacional de La Plata

Dependencia: Facultad de Ciencias Exactas – Departamento de Ciencias Biológicas.

Asignatura: Elementos de Farmacología.

Dirección: Calles 47 y 115

Ciudad: La Plata C. P.: 1900 Prov.: Bs. As.

Cargo que ocupa: Profesor Adjunto dedicación simple

7.

A.1 Actividad antioxidante de productos naturales de uso alimentario.

Propósito general.

Este trabajo es parte de un proyecto general que pretende evaluar distintas propiedades de diferentes alimentos o bebidas de uso frecuente en nuestra comunidad.

Actividad antioxidante total (CAT) de vinos argentinos

Introducción

Existe evidencia sobre los beneficios del consumo de dietas ricas en frutas y vegetales y de una moderada cantidad de vinos tintos en situaciones de salud asociadas a la producción de riesgo oxidativo (enfermedad cardiovascular, diabetes, inflamación, enfermedades degenerativas) (1,2).

Estos efectos protectores se atribuyen a la presencia en los alimentos citados de compuestos con actividad antioxidante, particularmente los polifenoles.

En los vinos, los principales compuestos fenólicos son los ácidos gálico y cafeico, epicatequina, catequina, cianidina y malvidina-3-glucósidos, rutina, miricetina, quercetina y resveratrol (3).

La Argentina posee regiones muy aptas para la producción vitivinícola siendo el vino obtenido de la *Vitis vinifera* var. Malbec, uno de los más representativos del país.

En la zona del Río de La Plata y particularmente en Berisso se cultiva la *Vitis labrusca* var. Isabela de la cual se obtienen los denominados vinos de la costa (VC).

Existe escasa evidencia sobre la capacidad antioxidante total (CAT) de los vinos Malbec argentinos producidos en diferentes regiones del país(4,5) y prácticamente ninguna sobre tal capacidad de los vinos producidos en la costa del Río de La Plata.

Objetivos

Como parte del proyecto general, este trabajo tiene como objetivos evaluar:

- A) la CAT de vinos Malbec de 4 regiones vitivinícolas argentinas y del vino tinto de la costa de Berisso utilizando diferentes modelos experimentales:
 - a) *captación de los radicales libres estables (DPPH. y ABTS •+)*
 - b) *reducción del Fe III del reactivo FRAP*
 - c) *la inhibición de la peroxidación lipídica del plasma humano inducida por cobre*
- B) El contenido de fenoles totales y antocianinas de los vinos en estudio.

Metodología

Toma de muestras.

El material de estudio se obtuvo de 3 botellas de cada vino adquiridas en un comercio local. Las muestras de vino se diluyen con DMSO a concentraciones variables de acuerdo al contenido de fenoles totales. De estas soluciones se realizaron diluciones apropiadas de acuerdo al ensayo a realizar.

Vinos estudiados

Los vinos Malbec estudiados fueron cosecha 2010. El nombre, origen, bodega, N° de lote, contenido alcohólico y precios/botella se indican a continuación:

- ✓ Salta: Elementos, El Esteco, Salta (INV S 1078508 L11103B) 13,5. \$ 23.00
- ✓ La Rioja: Santa Florentina, (INVCH 1058281 L 10354), 13,0. \$18.00
- ✓ Mendoza: Bianchi DOC, Bianchi, (INVS R) 1033408 L 1259), 13,2. \$19.50
- ✓ Neuquén: Newen, Bodega del Fin del Mundo, (INV N- 1081383 L 11223 A) 13,8. \$26.00

Vino de la Costa de Berisso (VC) cosecha 2012.

✓ Cooperativa de la Costa de Berisso. (INVNBA1096403), 12.0, \$14.00

Determinación de la capacidad antioxidante

Reacción con el radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH) (6)

La decoloración del radical estable DPPH[•] en solución metanólica (cromóforo violeta) por acción de un antioxidante se determina a 517 nm. Ácido cafeico se utiliza como compuesto de referencia. Los resultados se expresan como mg equivalentes de ácido cafeico (ECA) /mL vino

Reacción con el radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio (ABTS•+))(7)

La decoloración de radical catiónico ABTS•+ (cromóforo verde) es proporcional a la capacidad donante de hidrógeno de un compuesto o extracto en estudio. El radical ABTS•+ se produce por reacción entre ABTS (3,5 mM) y persulfato de potasio (1,25 mM) en AD. Se ajusta la absorbancia a 0,7 unidades a 732 nm con PBS y la actividad antioxidante se evalúa midiendo el cambio de absorbancia de la solución de ABTS •+. Los resultados se expresan como ECA/mL.

Medida de la capacidad reductora: Método FRAP, (Ferric reducing antioxidant potencial),(8)

La base del método consiste en la reducción del Fe⁺³-TPTZ (pardo) a Fe⁺²-TPTZ (azul) con un máximo de absorción a 593 nm. La intensidad del color es proporcional a la capacidad reductora de la muestra ensayada. La actividad se expresa como ECA/mL.

Inhibición de la peroxidación lipídica no enzimática (9)

Alícuotas de plasma humano heparinizado en PBS pH 7,4 (1:4) se incuban 3 horas a 37 °C con CuSO₄ (Cf: 1 mM) en presencia de los productos a ensayar (10-75 µL). El nivel de peroxidación se determina midiendo la aparición de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB). Butil hidroxi tolueno, (BHT) se utilizó como control positivo. Los resultados se expresan como % de inhibición de la peroxidación lipídica relativo al control sin la muestra.

Determinación de fenoles totales y antocianinas

El contenido de FT se determino por el método de Folin-Ciocalteu. Se basa en la oxidación de los fenoles por un reactivo compuesto de fosfomolibdeno y fosfotungsteno. La oxidación de los fenoles presentes en la muestra produce la aparición de una coloración azul que presenta un máximo de absorción a 765 nm y que se cuantifica por espectrofotometría.

La mezcla de reacción está constituida por 500 µl de extracto o compuesto de referencia, 250 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu 1N, 1250 µl de carbonato de sodio al 20% en cada tubo. Se prepara un blanco con todos los componentes en ausencia de extracto o compuesto de referencia. Después de 1 hora de reposo a temperatura ambiente, se lee la absorbancia a 765 nm. Los resultados se expresan como mg EQ ácido cafeico/ mL de vino. El contenido de antocianinas se determina por el método diferencial de pH (10). Su concentración se calcula de mediante la fórmula:

$$C \text{ (mg/L)} = \frac{\Delta DO \times 449 \times \text{factor de dilución} \times 1000}{26900}$$

Donde ΔDO es la diferencia de absorbancia a pH 1 y 4.5. 449 y 26900 son el PM y el coeficiente de extinción molar de cianidin-3-glucosido tomado como referencia.

Análisis estadístico. Se llevó a cabo mediante el análisis de variancia (Anova). Los resultados son promedios de 3 determinaciones/ botella realizadas por triplicado.

Resultados

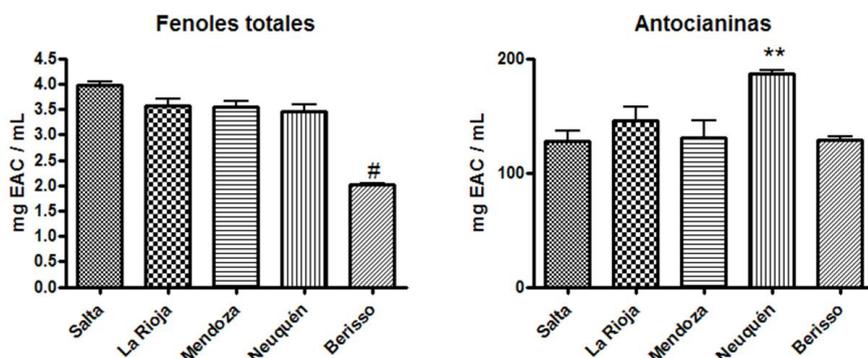


Fig.1 Contenido de fenoles totales y antocianinas de los vinos Malbec y el vino de la costa de Berisso.

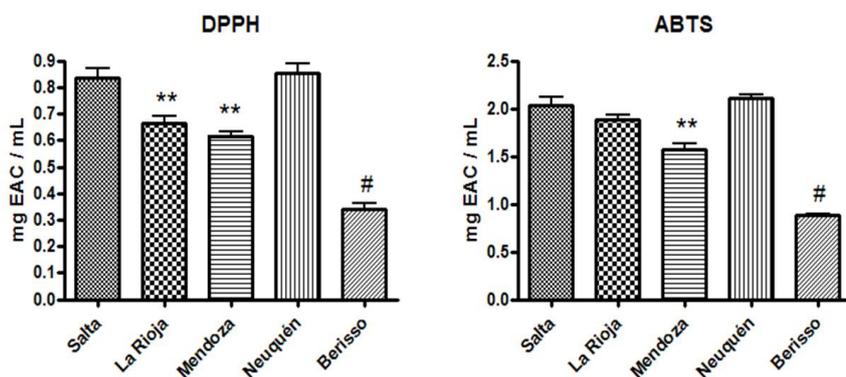


Fig.2. Capacidad de captación de los radicales libres estables DPPH y ABTS por los vinos Malbec y de la costa de Berisso

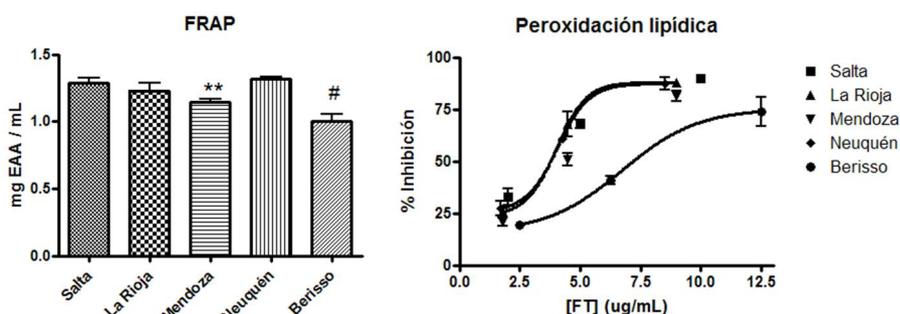


Fig.3. Capacidad de reducción del reactivo FRAP e inhibición de la peroxidación del plasma humano, inducida por Cu^{2+} por los vinos Malbec y de la costa de Berisso

Conclusiones

- Los dos tipos de vinos estudiados (Malbec y VC) mostraron muy buena CAT en los distintos modelos utilizados.
- No existe diferencia en el contenido de fenoles totales (FT) entre los Malbec de las regiones estudiadas. El contenido de FT es significativamente menor en el VC.
- El nivel de antocianinas es mayor en el Malbec de Neuquén.
- La capacidad de captación de los radicales DPPH y ABTS y la reducción del Fe(III) del reactivo FRAP es mayor en los vinos Malbec que en el VC.

Se observa una leve aunque significativa diferencia entre los vinos de Mendoza y la Rioja con respecto a los de Salta y Neuquén siendo la CAT mayor en los últimos.

e) La CAT de los vinos Malbec no se correlaciona con su contenido de fenoles totales y el mayor contenido de antocianinas en el Malbec neuquino podría ser, en parte, responsable de su mayor capacidad para atrapar radicales libres.

Por el contrario, la CAT del VC parece correlacionarse con su contenido de fenoles totales.

e) Los vinos Malbec de las diferentes regiones mostraron similar capacidad para inhibir la peroxidación lipídica del plasma humano, inducida por cobre y la potencia de los mismos fue significativamente mayor que la del VC.

Teniendo en cuenta estos resultados y los anteriormente obtenidos con otras muestras de vinos de las mismas regiones (Informe 2010-2011) se puede observar que existen diferencias en algunos ensayos, entre diferentes vinos de la misma región (ej. Vinos de Mendoza y La Rioja) y entre vinos de diferentes regiones dependiendo del año de cosecha y de la bodega de origen.

Se debe tener en cuenta que además de las diferentes características de las regiones vitivinícolas, los diferentes cultivos y procesos productivos están sometidos a otras variables, por lo que se requiere un análisis de cada cosecha para establecer los valores paramétricos que determinan la CAT de cada vino.

No obstante se puede concluir que este estudio revela una alta CAT en los vinos Malbec de las diferentes regiones vitivinícolas argentinas, apreciable fundamentalmente en el modelo biológico

utilizado donde se mide la capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica del plasma humano. Este estudio también permite sugerir que no existen diferencias significativas en la CAT de los vinos Malbec provenientes de las regiones vitivinícolas del país consideradas en el mismo. Con respecto al vino de la costa de Berisso, se puede concluir que su CAT, aunque alta, es significativamente menor que la de los Malbec como ha sido descrito para vinos brasileños obtenidos a partir de la variedad Isabella (11). No obstante, los parámetros estudiados lo proponen como un producto recomendable para el consumo desde el punto de vista del aporte de compuestos con actividad antioxidante.

Referencias

- 1) C. Manach, A. Mazur and A. Scalbert. (2005), Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases, *Current Opinion in Lipidology* **16** : 77–84.
- 2) Leighton, Urquiaga (2007). Changes in Cardiovascular Risk Factors Associated with Wine Consumption in Intervention Studies in Humans. *Annals of Epidemiology* **17**(5) Supplement 1: S32-S36
- 3) A. Ghiselli, M. Nardini; A. Baldi and C. Scaccini, 1998. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *J. Agric. Food Chem.* **46**(2)361-367
- 4) S. Lotito, M.L. Renart and C. Fraga (2002) Assessing the Antioxidant Capacity in the Hydrophilic and Lipophilic Domains. Study of a Sample of Argentine Wines. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **957**: 284–287.
- 5) K. Avalos Llano, S. C. Sgroppo y J.R. Avanza (2003). Actividad Antioxidante y Contenido en Fenoles totales en Vinos de Origen Nacional. *FACENA*, **19**: 11-19
- 6) Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. (1995). *Lebensm.-Wiss u. – Technol.* **28**:25-30.
- 7) Pannala, A.S., Rice-Evans, C.A., Halliwell, B and Sing, S. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1997); **232**:164-168.
- 8) Benzie, I, Strain, J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power". The FRAP assay. *Anal. Biochem.* (1996), **239**: 70-6
- 9) Schinella, G.R., Tournier, H.A., Máñez, S., de Buschiazzo, P., Recio, M., & Ríos, J.L. (2007). Tiliroside and gnapthaliin inhibit human low density lipoprotein oxidation. *Fitoterapia*. **78**: 1-6.
- 10) R.L. Prior, A. Cao, E. Martin, E. Sofic, J. Mc Ewen, C. O'Brien, N. Lischner, M. Ehlenfeld, W. Kalt, G. Krewer and M. Mainland. (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *J. Agric. Food Chem.*, **46**: 2686-2693.
- 11) S. L. Nixdorfa, I. Hermosín-Gutiérrezb. (2010) Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: Phenolic composition and antioxidant capacity. *Analytica Chimica Acta* **659**: 208–215

A.2 Determinación de la actividad antiinflamatoria de un extracto acuoso de yerba mate (*Ilex paraguariensis*)

La actividad antiinflamatoria se ha ensayado in vivo, en ratones hembra albinas de la raza Swiss. Los modelos utilizados fueron: Inhibición de la inflamación aguda en el modelo del edema plantar inducido por carragenina e inhibición de la inflamación crónica inducida por la aplicación repetida de el ester de forbol, TPA.

Este trabajo forma parte del llevado a cabo por el Prof. Ppal. Guillermo Schinella. (Ver informe CIC 2012)

Preparación y caracterización de la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales de un extracto acuoso de Yerba mate (*Ilex paraguariensis*)

Obtención del extracto acuoso liofilizado de yerba mate

El extracto de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*) se prepara en forma de infusión. La muestra comercial de la yerba mate (Establecimiento Las Marías, Corrientes, Argentina), (10g), se introduce en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se le añade agua destilada hirviendo (200 mL) y se deja enfriar hasta 40 °C. El extracto acuoso obtenido se filtra, se liofiliza (Rendimiento 10% p/p) y se conserva a 4°C hasta su uso. El liofilizado se disuelve en agua inmediatamente antes de realizar cada ensayo.

Caracterización del extracto:

Determinación de fenoles totales

La determinación del contenido total de fenoles se ha realizado siguiendo el método de Folin-Ciocalteu ya descrito previamente. Los resultados se expresan como mg EQ ácido gálico/ mg de extracto.

Determinación de la actividad antioxidante

Actividad captadora del radical catiónico 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) (ABTS⁺⁺)

Este ensayo se lleva a cabo como se describió en la sección anterior. La reacción captadora de ABTS⁺⁺ se inicia por la adición de 10 µl de diluciones apropiadas de extracto o compuesto de referencia (ácido gálico) a 990 µl de la solución de ABTS⁺⁺. La absorbancia de la mezcla se mide a 730 nm después de 30 min de añadir el extracto y compuesto de referencia. Los resultados se expresan como mg EQ ácido gálico/ mg de extracto.

Actividad reductora de Fe(III) - Ensayo FRAP

Este método se describió en la sección anterior. La reacción reductora de Fe(III) se inicia por la adición de 10 µl de diluciones apropiadas de extracto o compuesto de referencia (ácido ascórbico) a 990 µl de la solución de reacción. La absorbancia de la mezcla se mide a 590 nm 30 min después de añadir el extracto y compuesto de referencia. Los resultados se expresan como mg EQ ácido ascórbico/mg de extracto.

En la siguiente tabla se muestra la caracterización del extracto en cuanto a su contenido en fenoles totales, así como su capacidad captadora del radical ABTS⁺⁺ y reductora de Fe(III):

Fenoles totales	18 mg EQ ácido gálico/mg extracto
ABTS ⁺⁺	6 mg EQ ácido gálico/mg extracto
FRAP	33 mg EQ ácido ascórbico/mg extracto

Estudios proyectados.

En colaboración con el Dr. Félix Vega Lisi, Profesor del Depto. de Fisiología. Universidad de Santiago de Compostela, España se evaluará la actividad citotóxica de diferentes extractos obtenidos a partir de plantas de uso en la medicina popular argentina.

Algunos extractos, ej. *Hedeoma multiflorum* (tomillo serrano), *Satureja parvifolia* (muña muña), *Aloysia polystachya* (te de burro), *Aloysia gratissima* (palo amarillo), *Hypericum connatum* (cabotoril) entre otros, han sido evaluados en su toxicidad en nuestro laboratorio utilizando como modelo neutrófilos humanos (ver informes anteriores). El caso del extracto de tomillo serrano es interesante de acuerdo a su ya demostrada actividad apoptótica sobre neutrófilos.

Estos extractos y el de la yerba mate serán evaluados utilizando otro modelo celular como es el de hepatocitos primarios de rata en cultivo.

En este modelo se evaluará el efecto sobre el ciclo celular mediante citometría de flujo, la inducción de apoptosis mediante la actividad de caspasa 3 mediante espectrofluorimetría y el efecto sobre la viabilidad celular por el método MTT.

8. OTRAS ACTIVIDADES

8.1 Publicaciones

D. Fioravanti¹, G. Schinella^{1,2}, H. Tournier²

¹Cátedra de Farmacología Basica. Fac Cs. Médicas. UNLP ²Comisión de Investigaciones Científicas. Pcia Bs.As.

Capacidad antioxidante y contenido de polifenoles de vinos argentinos. Malbec y de la costa de Berisso (2011). *Tercera Época*. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Médicas-UNLP. Octubre, 2(3): 1-1

9. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.

Las correspondientes al cargo de Profesor Adjunto de Elementos de Farmacología en la Facultad de Ciencias Exactas. UNLP

Ellas consistieron en:

- Dictado de las clases teóricas y la realización de actividades de taller.
- Responsable de la elaboración y corrección de los exámenes de la materia
- Confección de guías para el aprendizaje de diferentes temas farmacológicos.

- Presidente de la mesa de examen final de la materia.