

CUANTIFICACIÓN DE RESVERATROL EN VINOS MEDIANTE HPLC

Atma-Sol Bustos;^{a,c} Juan C. Calisaya;^{a,c} Carolina Paredes;^{a,c} Gimena Durán;^b Marco Taquichiri;^b Juan A. Alvarado;^a J. Mauricio Peñarrieta;^{a,c}

^aCentro de Investigaciones en Química de Alimentos, Carrera de Ciencias Químicas, FCPN, UMSA, La Paz – Bolivia,

^bDepartamento de análisis CEANID, Departamento de Física UAJMS, Tarija – Bolivia, ^cInstituto de Investigaciones en Productos Naturales (IIPN), Carrera de Ciencias Químicas, Universidad Mayor de San Andrés, Calle Andrés Bello y Calle 27 Cota Cota, Edificio FCPN, 2º piso, La Paz- Bolivia.

Accepted: 12/11/12

Published: 09/12/12

Keywords: Resveratrol, Vinos, HPLC.

ABSTRACT

Resveratrol, a phenolic compound, was quantified in wines from Tarija - Bolivia by a method by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The method was validated considering parameters such as standard deviation (S), coefficient of variation (CV), linear correlation coefficient (R), limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ). The amount of resveratrol found in the wines analyzed is somewhat high compared to values reported worldwide, giving an average of 7.7 ± 0.9 mg / L.

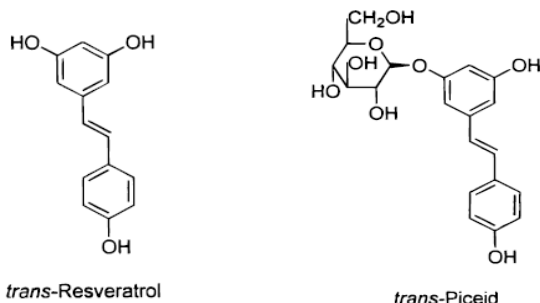
*Corresponding author: atma_sol@hotmail.com

RESUMEN

El Resveratrol, un compuesto *fenólico*, fue cuantificado en vinos procedentes de micro vinificación en Tarija – Bolivia mediante un método por cromatografía Líquida de Alta Resolución con siglas en inglés HPLC en fase reversa. El método fue validado considerando parámetros de desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV), coeficiente de correlación lineal (R), límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ). La cantidad de resveratrol hallada en los vinos analizados es algo elevada comparada con valores reportados a nivel mundial, dando como promedio $7,7 \pm 0,9$ mg/ℓ

INTRODUCCION

En los últimos años muchos estudios han demostrado que el consumo moderado de vino es beneficioso para la salud, relacionándolo con la prevención de trastornos degenerativos como la enfermedad de Alzheimer o demencia senil entre otros [1] [2] [3] [4]. El compuesto vinculado con estos efectos es el resveratrol [2] [3] [4]. El resveratrol, un compuesto fenólico categorizado como fitoalexina, se encuentra en mayor cantidad en raíces de *Polygonum cuspidatum*, planta utilizada en oriente contra males cardiovasculares [5] [2]; también se encontraron en uvas y en productos producidos con éstas como el vino [3] [4] [6]; otras fuentes de obtención son el cacao y sus derivados, pistacho, granulados de lúpulo (en la cerveza se encuentra en muy poca cantidad), granos de maní y en mantequilla de los mismos, arándano y otros [2] [6] [7]. El isómero hallado con mayor frecuencia es el *trans* – resveratrol [2]. Usualmente, se encuentra acompañado de su derivado *glicosilado* (*trans* - piceado).



Estos compuestos se encuentran significativamente en los vinos tintos. La concentración de estos compuestos en el vino depende de varios factores, como son la variedad de uva, las condiciones del suelo, el clima, la radiación UV y otros [2]. Por estas razones se propone la hipótesis de que los vinos producidos en Bolivia (vinos de altura) presentan mayor contenido de resveratrol, lo que impulsa a que esta variable sea investigada en los mismos. La técnica analítica escogida para realizar este análisis fue la del HPLC debido a que ésta es rápida, reproducible, confiable y no necesita gran cantidad de analito en comparación con técnicas clásicas [8]. Dependiendo del detector que presenta el equipo HPLC (DAD o UV-VIS) la interpretación de los espectros varía ligeramente, por lo que en el presente trabajo se tomaron en cuenta ambos casos haciendo uso de dos diferentes equipos de HPLC: Agilent (con detector DAD) y Perkin Elmer (con detector UV-VIS). Al mismo tiempo de indicar la metodología utilizada para interpretar los espectros se da a conocer el tratamiento estadístico mínimo que valida el método de HPLC empleado.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Curva estándar y validación del método de HPLC empleado:

La curva estándar promedio es la siguiente:

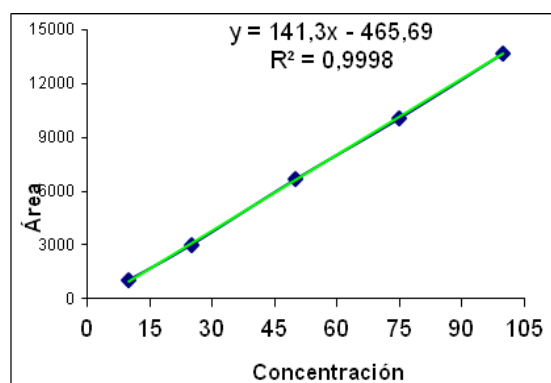


Figura 1. Curva Estándar – HPLC Agilent.

Los parámetros que validan el método son los presentados a continuación:

Tabla 1. Parámetros de validación del método HPLC.

Desviación estándar (S)	297,9
Coefficiente de variación (CV) (%)	2,9
Coefficiente de correlación lineal (R)	0,999
Límite de detección (LOD) (ppm)	1,67
Límite de cuantificación (LOQ) (ppm)	5,6

El CV recomendado es entre 1 y 20 % [2]. Nuestro valor se encuentra dentro de lo permitido. El bajo valor de variación se debe en su mayoría al manipuleo humano ya que las mediciones que realizan este tipo de equipos no presentan grandes errores, por lo general el CV de lectura de un HPLC suele ser entre 1 y 2 % [2]. El valor de R es superior a 0,999 que es el rango aceptable propuesto [2] [9]. El valor de LOD encontrado está por debajo del hallado por Lamuela-Ravenot et al. en vinos, quien reportó un LOD de 3 ppm [2] lo que indica una mayor sensibilidad del equipo.

Identificación de resveratrol en vinos mediante HPLC:

A continuación se muestra, mediante cromatogramas, las dos maneras de cuantificar resveratrol en vinos: por comparación con el tiempo de retención del patrón (Figura 2) y por el método de adición estándar (Figura3) dependiendo del detector del equipo HPLC

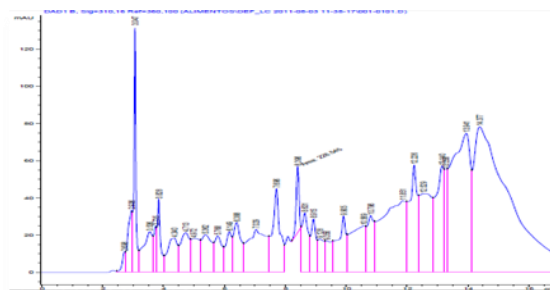


Figura 2. Cromatograma HPLC con DAD – vino 8E1 (incluido el espectro UV del resveratrol)

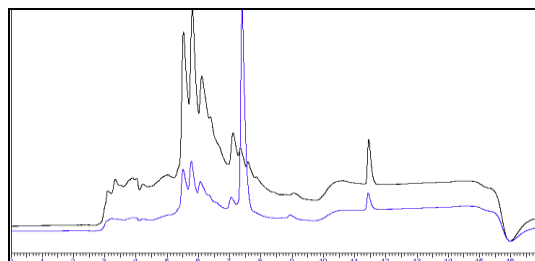


Figura 3. Cromatogramas sobrepuestos de HPLC con detector UV – vino 3E2 sin dopar y dopado con estándar de resveratrol.

Como se ve en la Figura 3, bajo este método es factible la identificación de compuestos. Muchas veces no es suficiente comparar el tiempo de elución debido a que este puede salir ligeramente diferente cuando se analizan muestras complejas, o en todo caso puede ser confundido con la señal de otro analito por su proximidad a la señal deseada, bajo este método se aclara el espectro y se puede hacer la correspondiente integración del pico.

Cuantificación de resveratrol en vinos mediante HPLC:

Realizando la correspondiente integración se obtiene:

Tabla 2. Cantidad de resveratrol en vinos.

Vino	Concentración (ppm)
1E0	7,3
2E1	7,9
3E2	7,8
8E1	9,8
7E0	8,1
9E2	7,9
10E0	7,0
11E1	6,9
12E2	6,9

Los valores obtenidos son superiores al límite de cuantificación del HPLC empleado en este análisis cuantitativo (ver Tabla 1), a pesar de que el parámetro de límite de cuantificación aun está en discusión por la comunidad científica, nos da cierta confiabilidad en el análisis realizado. Para comparar los resultados con otras regiones del mundo se diseña la siguiente tabla:

Tabla 3. Promedio de niveles de trans-resveratrol en vinos tintos de diferentes regiones

Concentración de <i>trans</i> – resveratrol (mg/ℓ)				
Región	Inferior	Superior	Promedio**	Número de muestras
Bolivia*	6,9	9,8	7,7 ± 0,9	9
Canadá	1,2	5,8	3,2 ± 1,4	7
Republica Checa	0,7	10,5	2,8 ± 1,9	52
Francia	0,3	7,6	2,8 ± 1,6	27
Brasil	1,1	5,8	2,7 ± 1,5	18
Hungría	0,1	14,3	2,4 ± 2,1	67
Australia	0,2	10,6	2,0 ± 2,6	14
Italia	0,3	7,2	2,0 ± 1,5	67
China	-	3,2	1,8 ± 1,3	5
Portugal	-	5,2	1,5 ± 1,1	22
España	-	8,0	1,4 ± 1,4	103
Estados Unidos	-	5,8	1,3 ± 1,6	37
Chile	0,8	1,6	1,2 ± 0,4	4
Grecia	-	2,5	1,0 ± 0,5	57
Japón	0,1	2,3	1,0 ± 0,6	22
Argentina	0,6	1,8	1,1 ± 0,4	14

*Valores obtenidos en el presente trabajo, en muestra de vinos tintos; ** El error corresponde a la desviación estándar; - valores fuera del límite de detección [7] [5].

Como se observa en la Tabla 3, el valor promedio de resveratrol en vinos tintos en Bolivia es algo elevado en relación a otros países. Sin embargo, es necesario realizar mayor cantidad de mediciones y ampliar de universo de muestras para poder sacar conclusiones significativas.

SECCIÓN EXPERIMENTAL.

Reactivos.

Resveratrol fue comprado de ChromaDex (Irvine, CA, USA) y metanol grado HPLC de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Método HPLC.

El compuesto Resveratrol fue separado utilizando un HPLC Agilent que contiene un desgasificador (G1322 A), un sistema de suministro de solvente (QuatPump-G1311A) una ALS autoinyector (ALS G1329A), un horno de columna (Colcom - G1316A) y un detector de arreglo de diodos (G1315B). Por otro lado, se utilizó un equipo HPLC Perkin Elmer Total Chrom (v6. 2.0.0.1), que cuenta con un desgasificador, bomba cuaternaria, autoinyector, horno de columna y detector múltiple de UV/Vis (series 200), del Centro de Análisis Investigación y Desarrollo CEANID de la ciudad de Tarija. En ambos equipos se utilizó una columna de fase reversa Kromasil 100-5C18 (250 x 4,6 mm) protegida por una pre-columna de 10 mm (Scantec Lab, Sävedalen, Suecia).

El método empleado es el presentado por Peñarrieta et al., 2011 [9]. El volumen de inyección es de 20 µℓ y el flujo de 0,8 mL/minuto. La temperatura de la columna se mantiene constante a 25° C.

Para la fase móvil se utiliza un sistema de flujo binario que consiste en:

- Solvente A: 1% de ácido acético/agua
- Solvente B: Metanol

El tiempo de elusión es de 17 minutos bajo el siguiente gradiente:

Tabla 4. Gradiente de la fase móvil

Tiempo (min)	Solvente A	Solvente B
0 – 5	60	40
5 – 10	35	65
10 – 15	10	90
15 – 17	60	40

La longitud de onda a la que se trabaja es de 310 nm considerando que este corresponde al máximo de absorbancia de la molécula de resveratrol.

El software empleado para controlar el equipo HPLC Perkin Elmer es el TotalChrom Workstation, versión 6.3. Y para controlar el HPLC Agilent se utiliza el Chemstation Revision B.04 2009.

Curvas estándar.

Las curvas estándar son preparadas con soluciones de diferente concentración de resveratrol patrón disuelto en metanol.

Al considerar el área de los picos obtenidos se tienen las ecuaciones que rigen el comportamiento del área del pico respecto a la concentración.

Otra utilidad que se les da a las soluciones patrón es que la señal emitida por éstas indica el tiempo de elución característico de cada compuesto según el método empleado, por lo que facilita la detección del compuesto en una muestra.

Validación del método en HPLC.

Para esto se realizan 4 curvas estándar en el HPLC Agilent. Con estos valores y mediante métodos estadísticos calculados por Microsoft Excel se puede obtener reproducibilidad, linealidad, límite de detección y límite de cuantificación.

- **Reproducibilidad.**

Para evaluar este factor en el HPLC se inyectan 4 soluciones de resveratrol disuelto en metanol a 75 ppm. La reproducibilidad o precisión se expresa como la desviación estándar (S) o el coeficiente de variación (CV) [10].

- **Linealidad.**

La linealidad se determina mediante la inyección de las siguientes 5 concentraciones de soluciones de resveratrol en ppm: 10, 25, 50, 75 y 100. Para cada concentración se realiza cuatro medidas que posteriormente son promediadas para construir la curva de calibración y obtener el coeficiente de correlación lineal (R).

- **Límite de Detección (LOD) y Límite de Cuantificación (LOQ).**

El límite de detección del analito es aquella concentración que proporciona una señal en el equipo significativamente diferente a la del blanco. En términos prácticos, es la concentración de analito que proporciona una señal igual a la emitida por el blanco más 3 veces la desviación estándar del mismo [10]. Haciendo las consideraciones adecuadas, este valor se puede obtener a partir de la ecuación lineal y los errores asociados a la misma [10].

El de cuantificación es el límite inferior para medidas cuantitativas precisas. El LOQ se considera igual a la señal del blanco más 10 veces la desviación estándar del blanco [9], pero de igual manera que el LOD, puede ser hallado a partir de la ecuación lineal que proporciona la curva estándar [10].

Identificación de resveratrol en vinos mediante HPLC.

En el caso de contar con un detector arreglo de diodos (DAD), las señales emitidas por el resveratrol pueden ser identificadas directamente del espectro obtenido del HPLC, donde se puede observar sin ningún problema el espectro UV-VIS de cada componente separado mediante el equipo.

Cuando sólo se tiene un detector UV-VIS el resveratrol presente en los vinos se identifica por comparación con el tiempo de retención del patrón (cosa que también se hace con el DAD) y por el método de adición estándar que consiste en dopar la muestra, es decir, se le agrega una solución de resveratrol al vino para después observar cuál es el pico que se incrementa y así poder asegurarnos que es el compuesto buscado.

Cuantificación de resveratrol en vinos mediante HPLC.

En el presente trabajo se analizan 9 tipos de vinos obtenidos de una microvinificación realizada el 2011 por el departamento de física de la Universidad Autónoma Juan Misael Saracho (UAJMS), los códigos de los vinos son 1E0, 2E1, 3E2, 7E0, 8E1, 9E2, 10E0, 11E1, 12E2. El resveratrol presente en cada muestra es identificado con un detector arreglo de diodos. Una vez identificados los picos se prosigue a la integración de los mismos para después remplazar el área obtenida de cada pico en la ecuación resultante de la curva estándar.

CONCLUSIONES.

El método empleado al ser validado satisfactoriamente demostró ser eficiente para la determinación del resveratrol. Los resultados obtenidos sugieren que los vinos producidos en altura tienen un contenido algo elevado en comparación con otras latitudes del planeta, aunque más estudios son necesarios para establecer esta diferencia. Enfocándonos en lo que es el equipo HPLC se puede decir que un detector arreglo de diodos (DAD) es mejor a uno UV/VIS. Con el detector DAD nos evitamos el trabajo de realizar adición estándar para la identificación de picos, ahorrándonos tiempo y material de análisis.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Agencia de Cooperación Sueca ASDI.

Las pruebas en el HPLC Perkin Elmer, fueron realizadas en el Laboratorio CEANID de la Universidad Autónoma Juan Misael Saracho UAJMS de Tarija.

REFERENCIAS

1. www.muyinteresante.es/una-copa-de-historia-una-copa-de-salud
2. POTREBKO, I., RESURRECCIÓN, A.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 7750.
3. PÉREZ, A., IBERN, M., LAMUELA, R., DE LA TORRE, M.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47, 1533.
4. MORENO, A., CASTRO, M., FALQUÉ, E.
Eur Food Res Technol, 2008, 227, 667.
5. STERVBO, U., VANG, O. BONNESES, C.
Food Chemistry, 2007, 449.
6. LI, X., WU, B., WANG, L., LI, S.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 8804.
7. BARBEITO, ROMANO, GARGANTINI. Documento no publicado.
8. SKOOG, HOLLER, NIEMAN.
Principios de Análisis Instrumental, 2001, McGrawHill.
9. PEÑARRIETA, J.M., SALLUCA, T., TEJEDA, L., ALVARADO, J.A., BERGENSTAHL, B.
Journal of Food Composition and Analysis, 2011, 24, 580.
10. MILLER, J., MILLER, J. Estadística y Quimiometría para Química Analítica, 2002, Prentice Hall.