

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Comparación de métodos para la determinación de**

**Resveratrol en vino tinto**

**Monografía previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias  
Químicas con mención en Química Analítica**

**ANDREA ESTEFANÍA COELLO JORDÀN**

**Quito, 2017**

Certifico que la Monografía de Licenciatura en Ciencias Químicas con mención en Química Analítica, de la Srta. Andrea Estefanía Coello Jordán ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra. Lorena Meneses Oviedo  
Directora de la Monografía  
Quito, 18 de diciembre de 2017

## DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTO

“Si los amantes del vino y del amor van al infierno..., vacío debe estar el paraíso”

-Omar Khayyam (Poeta, astrónomo y matemático)

Gracias a todos aquellos que me han ayudado, apoyado y acompañado durante esta etapa de mi vida estudiantil. A todas las personas que me enseñaron a ser una mejor versión de mí misma, como profesores y autoridades, a mis compañeros por caminar conmigo en un mismo sentido, quienes me enseñaron la amistad y el trabajo en equipo. A Dennise, Nicole, Dome y Nicolay por ser infaltables. A mi familia, por empujarme siempre a seguir adelante, a mis abuelitas por sus oraciones y a mis padres por su amor y apoyo económico para culminar esta etapa.

A cada una de las personas que confiaron en mí.

**TABLA DE CONTENIDOS**

1.	RESUMEN .....	1
2.	ABSTRACT .....	2
3.	INTRODUCCIÓN .....	3
3.1	OBJETIVO GENERAL .....	5
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
3.2.1	OBJETIVO ESPECÍFICO 1.....	5
3.2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO 2.....	6
3.2.3	OBJETIVO ESPECÍFICO 3:.....	6
4.	DESARROLLO TEÓRICO .....	7
4.1	UVA.....	7
4.2	VINO .....	9
4.3	RESVERATROL .....	12
4.4	TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN Y PREPARATIVAS.....	15
4.5	TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	18
4.6	IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RESVERATROL.....	36
5.	CONCLUSIONES.....	41
6.	RECOMENDACIONES .....	42
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
8.	FIGURAS .....	47
9.	TABLAS .....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del resveratrol. ....	47
Figura 2. Biosíntesis del <i>trans</i> -resveratrol.....	48
Figura 3. Estructura química del <i>trans</i> -resveratrol y del <i>trans</i> -piceida glucósido ....	49
Figura 4. Micro extracción con sorbente empaquetado .....	49
Figura 5. Cromatogramas de vino blanco y vino tinto utilizando detector de absorbancia y de fluorescencia .....	50
Figura 6. Espectro del <i>trans</i> -resveratrol y del pseudo ion molecular con $m/z= 229$ con ionización positiva.....	50
Figura 7. Espectro del <i>trans</i> -resveratrol y del pseudo ion molecular con $m/z= 227$ en modo de ionización negativa .....	51
Figura 8. Espectro de resveratrol en HPLC con detector UV.....	51
Figura 9. Espectro de resveratrol en HPLC con detector de masas.....	52

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Desventajas de las diferentes técnicas de extracción utilizadas para la determinación de resveratrol.....	53
Tabla 2. Límites de detección del <i>cis</i> y <i>trans</i> resveratrol y tiempo de análisis de acuerdo a cada técnica aplicada.....	53
Tabla 3. Concentraciones de trans-resveratrol de acuerdo a cada técnica referida.....	54
Tabla 4. Efecto del solvente en el porcentaje de recuperación de resveratrol por 10 ppm de solvente utilizando la microextracción con sorbentes empaquetados.....	54

## 1. RESUMEN

El presente trabajo de investigación bibliográfica, tuvo como objetivo presentar algunas de las diferentes técnicas para la determinación de resveratrol en vino tinto, con la finalidad de realizar una comparación y un análisis de las mismas, y de esta manera sustentar la utilización de un método. Se han considerado tres técnicas fundamentales que son las más utilizadas: cromatografía líquida de alta eficiencia con detector UV, cromatografía de gases con detector de masas y cromatografía líquida con detector de masas. Sin embargo, existen otras técnicas que se han probado en los últimos años, tales como electroforesis capilar y desorción laser. Con estas técnicas acopladas a un correcto método de extracción previo, se logra determinar el resveratrol, *trans*, *cis* y *piceida*. Los métodos de extracción comúnmente utilizados, son la extracción en fase sólida, la micro extracción y la extracción con sorbentes. Estas técnicas de extracción van a depender del método a utilizarse, especialmente del detector con el que se trabaje. En cuanto a la preparación de la muestra también se debe cuidar la exposición del *trans*-resveratrol ya que éste tiende a la isomerización en *cis*-resveratrol. La concentración de resveratrol en los vinos tintos fue mayor que la de los vinos rosados o blancos, según la literatura, esto debido a que el resveratrol se encuentra en mayor contenido en la piel de las uvas, y de acuerdo al proceso de vinificación de cada uno de los vinos, el contenido de este compuesto incrementa o disminuye. La concentración promedio de resveratrol reportada en la literatura, en vino oscila entre 0,1 a 15 mg/L. El método más utilizado es el HPLC con detector UV, donde las longitudes de onda son de 306 nm para el *trans*-resveratrol y 285 nm para el *cis*-resveratrol. En cuanto al trabajo en LC-MS, la relación m/z de transición se encuentra en 227/185. Este tipo de estudios donde se determina la concentración de resveratrol, tienen la finalidad de dar a conocer las propiedades antioxidantes en los vinos, además, con la comparación de métodos se podrá elegir un mejor método de análisis. De acuerdo a los resultados de la literatura, se logra identificar a HPLC-UVvis como el mejor método para la determinación de resveratrol.

Palabras clave: GC-MS, HPLC-UV, LC-MC, resveratrol, uva, vino,

## 2. ABSTRACT

The present work of bibliographic investigation has as objective to demonstrate some of the different techniques for the determination of resveratrol present in red wine. The theoretical investigation let to make a comparison of the methods in order to sustain the utilization of each. For achieve the objective, three fundamental techniques have been considered: High Performance Liquid Chromatography with UV Detector, Gas Chromatography with Mass Detector and Liquid Chromatography with Mass Detector. However, there are other techniques that have been tested in recent years such as Capillary Electrophoresis and Laser Desorption. With all of these techniques, plus a correct extraction method is easy to determine the presence of resveratrol, *trans*, *cis* and *picoid* in red wine. The extraction methods that are commonly used are: the extraction in solid phase, the micro extraction, and the extraction with sorbents. These methods will depend on the detector that is used. About the preparation of the sample, it is important to care about of the exposition of the *trans*-resveratrol since this tends to isomerization resulting in *cis*-resveratrol. The concentration of resveratrol in red wine is higher than the concentration in rose or white wine, due to the fact that resveratrol is found in higher content in the skin of the grapes, and according to the vinification process of each of the wines, the content of this compound increases or decrease. The average concentration of resveratrol reported in the literature, in wine ranges from 0.1 to 15 mg / L. The most commonly used method is HPLC with UV detector, where the wavelengths are 306 nm for *trans*-resveratrol and 285 nm for *cis*-resveratrol, for LC-MS work, the transition m/z ratio is 227/185. This type of studies (where the concentration of resveratrol is determined) have the purpose of making known the antioxidant properties in wines, and based on this information the best analytical method could be chosen. According to the results of the literature, HPLC-UVvis is identified as the best method for the determination of resveratrol.

Key word: *GC-MS, grape, HPLC-UV, LC-MC, resveratrol, wine*



### 3. INTRODUCCIÓN

El resveratrol es un compuesto que en la actualidad es mencionado en la literatura por su poder antioxidante y sus propiedades benéficas en la salud. Este compuesto se lo encuentra en la piel de las uvas, en su mayoría, y por esta razón es analizado también en el vino producido a partir de éstas. Así mismo, de acuerdo al proceso de elaboración de vino, el vino tinto posee mayor cantidad de resveratrol, es por esto que los estudios de este antioxidante está mayormente direccionado a éste tipo de vino.

A través del tiempo, se han realizado algunos estudios donde se conocen los procesos de la transformación del mosto de uva en vino, y desde entonces, se ha adentrado en el estudio y determinación de polifenoles debido a su propiedad antioxidante. Los polifenoles, sobre todo el resveratrol, ha sido un compuesto de interés por su eficacia para captar radicales libres y funcionar como agente antioxidante, por lo que hasta la actualidad se siguen realizando investigaciones sobre este tema (Cenusa, 2016).

La presencia de resveratrol se identificó en 1992, y desde ahí se habla de una “paradoja Francesa” la cual se refiere a que la población de esta región, a pesar de su alto consumo de grasa en sus dietas, tenían bajos índices de enfermedades cardiovasculares debido al consumo de vino. Desde entonces se han realizado varios estudios, además que se han planteado diferentes hipótesis con respecto a este tema. Con esto, la química y la medicina han intentado fijar más atención a los efectos antioxidantes del vino y sobre todo a sus efectos benéficos cardiovasculares y neuroprotectores. En la actualidad, la ciencia se ha fijado más en el aislamiento del resveratrol que el análisis en sí, es por esto que los estudios descritos en este trabajo están basados en trabajos e investigaciones realizadas a principios de los 90’s hasta el 2000, ya que de ahí en adelante lo que se hizo con el resveratrol fue aplicarlo en medicamentos, alimentos y productos cosméticos (Masis, Vega y Sánchez, 2013).

En lo que se refiere a efectos antioxidantes, los estilbenos, en especial el resveratrol, ha sido estudiado y se ha demostrado una actividad protectora muy fuerte en las células, al tener efectos inhibidores sobre agentes oxidantes, como los tóxicos y los radicales libres (Marques, 2014). Los beneficios de este compuesto se han certificado tanto en la ingesta de uvas como en el vino tinto (Marques, 2014). Así también, se ha demostrado que el consumo moderado de vino es beneficioso para la salud, ya que se asocia con la prevención de trastornos degenerativos como la enfermedad de Alzheimer o demencia senil entre otros (Masis, et al., 2013).

Dependiendo de la dosis, el resveratrol puede llegar a tener una propiedad anticancerígena. Así también, se ha estado investigando el uso de resveratrol como tratamiento farmacológico de diversas enfermedades y factores de riesgo asociados con el envejecimiento, y esto ha demostrado ser una alternativa prometedora (Masis et al., 2013).

En la actualidad, existen pocos estudios implementados para la comparación del porcentaje de resveratrol necesario en el cuerpo humano, en relación a la cantidad que se encuentra de este compuesto en el vino. Es importante mencionar que, en los últimos años, este compuesto ha recibido atención creciente por sus beneficios en el cuerpo humano, y un gran número de laboratorios farmacéuticos han intentado aislar este compuesto para agregarlo en medicamentos (Masis et al. 2013).

Con el desarrollo de este tema, no solo se pretende conocer las características y beneficios del resveratrol, sino también conocer los porcentajes de éste en el vino tinto, para de esta forma desmentir o apoyar lo que en los últimos años se ha dicho sobre las propiedades antioxidantes del vino dada por todos los polifenoles, pero sobre todo por el resveratrol. Conociendo el porcentaje, se podrá decir si éste es significativo. Así también, este documento y análisis será útil para conocer propiedades del resveratrol y sus funciones más relevantes.

Por otro lado, se busca definir una técnica con la que se pueda optimizar la identificación y cuantificación de este compuesto fenólico, y de esta manera igualmente demostrar, si los vinos tienen las cantidades significativas de lo que sería un compuesto fenólico, en este caso el resveratrol. Al conocer el método de análisis, se facilita la identificación y el aislamiento del resveratrol para una posterior utilización, ya sea en medicamentos, en la industria farmacéutica o en la industria cosmética, como por ejemplo en cremas que prevengan el envejecimiento celular (Lucas, 2009)

En ciertos estudios se asegura que la técnica óptima para la determinación de resveratrol es el HPLC, identificando una concentración de 0,1 a 15 mg/L en una muestra, sin embargo, estudios más recientes utilizan otras metodologías como electroforesis capilar, en donde se asegura que la técnica es más eficaz en cuanto a tiempo de análisis y obtención de resultados, pero se deben cuidar temas como la preparación de la muestra (Montero, 2001).

El siguiente trabajo tiene como objetivo, realizar un estudio y una comparación de métodos para la determinación y cuantificación de resveratrol en vino, con el fin de elegir el más adecuado en futuros ensayos.

### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Comparar los métodos de determinación de resveratrol, de acuerdo a la eficiencia en la identificación y cuantificación de la molécula presente en diferentes tipos de vino tinto.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

#### **3.2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO 1**

Comparar los valores de resveratrol reportados en la literatura en distintos tipos de vino utilizando diferentes métodos analíticos.

### **3.2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO 2**

Contrastar los métodos analíticos para la determinación de resveratrol y concluir ventajas y desventajas de cada uno de éstos.

### **3.2.3 OBJETIVO ESPECÍFICO 3:**

Evaluar las técnicas de preparación de muestra para la identificación de resveratrol y seleccionar la más eficiente.

## 4. DESARROLLO TEÓRICO

### 4.1 UVA

Existen más de tres mil variedades de uvas que se pueden dividir en dos grandes grupos. En primer lugar, están las uvas de mesa que se consumen frescas o desecadas, carnosas, y con distintos colores: amarillas, verdes, granates o violetas. Por otro lado, están las uvas viníferas, que son en general más ácidas que las uvas de mesa, éstas se utilizan para la producción de vino, ya sea desde su pulpa hasta su cáscara o únicamente con su pulpa (Marques, 2014). La *Vitis* vinífera, engloba gran cantidad de variedades clásicas, donde las uvas especiales para elaborar vino son las cepas de *Vitis* vinífera blanca y negra, las provenientes de especies de vides europeas, y uvas frescas maduras o sobre maduras (Prez y De Rincon, 2000). Se sabe que el sabor del vino depende del tipo de uva que se utilice, ya sea por el tipo de suelo donde se cultiva, o la época de cosecha de este fruto (Marques, 2014).

En la actualidad, el valor de la uva para la salud humana se debe principalmente a la presencia de sustancias bioactivas que son responsables de su color, aroma y textura característicos, y sobre todo por las propiedades beneficiosas en el organismo (Marques, 2014).

La uva *Cabernet* es la más famosa y difundida en el mundo, es de origen francés y tiene dos variedades, *Cabernet Franc* que proporciona un vino brillante y *Cabernet Sauvignon* que se caracteriza por ser rica en taninos, dando un color rojo intenso al vino. La uva *Malbec* es francesa y ha sido adoptada por los viñedos argentinos y chilenos. La uva *Merlot*, produce vinos aromáticos y suaves que maduran rápidamente, es una uva francesa utilizada en varias partes del mundo por su adaptación a los diversos climas y suelos (Prez y De Rincon, 2000).

Cabe mencionar que la uva debe pasar un proceso de fermentación para la transformación de zumo en vino, este proceso se conoce como *vinificación*; la

vinificación es la elaboración de cualquier tipo de vino de mesa y se define como el producto de la descomposición química del jugo de uva fresca y su fermentación alcohólica. En forma química, se explica como la descomposición de azúcar en alcohol y anhídrido carbónico, debido a la acción de las levaduras (Prez y De Rincon, 2000).



En la vinificación, la uva se aprovecha en un 100%, para empezar, está la piel, de la cual se ocupa el 7-8 %, aquí las levaduras son responsables de la fermentación, ésta es la materia colorante en vino tinto mas no en el vino blanco. Luego se tienen las pepas, que se ocupan del 3-4 % en el proceso de vinificación. La pulpa, se utiliza un 80-85 % debido a que en ésta se encuentra el jugo de uva, agua, ácidos y otros elementos. El escobajo, que es la estructura vegetal del racimo, contiene taninos, potasio y agua (Prez y De Rincon, 2000).

Esta fermentación que se da por la descomposición química del jugo de uva, se lleva a cabo en depósitos de acero inoxidable o de hormigón y existen dos tipos de fermentación, la fermentación alcohólica y la fermentación maloláctica (Alonso, 2013).

#### **4.1.1 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA**

En este proceso, la transformación de los azúcares en alcohol se da debido principalmente a la acción de las levaduras que se encuentran dispersadas en el medio ambiente, cabe recalcar, que no solo se genera alcohol etílico sino también dióxido de carbono. Durante este proceso, además se liberan otro tipo de sustancias que influyen en la calidad final de vino, tales como ácido succínico y acético y algunos alcoholes superiores (Alonso, 2013).

Dentro de toda fermentación, se debe considerar la presencia de factores químicos como el oxígeno, el cual favorece el crecimiento de las levaduras, sin embargo, en la producción de vino es mejor controlar la presencia de oxígeno, para



de gran trascendencia, ya que este proceso tuvo una importante evolución en cuanto a la calidad medida en base al grado alcohólico, y sobre todo por la cantidad de polifenoles (Cenusa, 2016).

En cuanto a la preparación de vino blanco y rosado, se realiza primeramente un prensado, de donde se extrae el mosto, luego se realiza una limpieza al mosto. Para modificar el color, se utiliza la aireación intensa y carbón vegetal para decolorarlo. Así también, el vino blanco o rosado se puede obtener de uvas donde se separó el hollejo, es decir, la piel de la uva de la pulpa (Collado, 2001).

Refiriéndose al vino tinto, la fermentación y preparación es igual, donde además de la pulpa de la uva, se utiliza la piel y en ocasiones las pepas, durante la fermentación (Collado, 2001).

Cabe mencionar que existe una gran variedad de vinos, y como se ha mencionado, depende de su elaboración como de la materia prima con la que se realiza, es decir, de la uva. Entre los vinos más estudiados tenemos el *Cabernet Sauvignon* y el *vino rosado* (Fernandez, 2017).

El *Cabernet Sauvignon*, es el vino más famoso, pues posee una fragancia y un sabor fuerte. La procedencia de este tipo de vino es la más conocida del mundo, plantada en la zona de Burdeos. Es de color intenso, y tienen un aroma inconfundible, la mezcla entre frutal y floral. Las uvas de este vino vienen de un racimo pequeño a mediano, la piel de la uva es espesa y dura, mientras que su pulpa es de sabor astringente (Señorio de Nevada, 2015).

También se tiene el vino *Grenache* o garnacha, éste varía por sus uvas y su propiedad de cultivo, normalmente tiene un sabor suave, posee mayor graduación alcohólica, y la uva garnacha también es utilizada en vinos rosados (Fernandez, 2017).



Un vino famoso es el *Malbec*, es más conocido en Argentina y Francia. Los *Malbec* franceses suelen caracterizarse por tener una uva con estructura fuerte y gran cantidad de taninos. Tienen sabor más frutal, como a violeta, mora o ciruela (Fernandez, 2017). En general, los *Malbec* son vinos oscuros con sabor a mora o a ciruelas negras.

Los vinos *Merlot*, también conocidos como vino tinto, se dan más en la región de Francia e Italia. Este vino madura rápidamente, tiene gran porcentaje de alcohol, y aroma afrutado (Fernandez, 2017). Los aromas característicos de este vino, se debe a los frutos rojos, las uvas que se utilizan en la elaboración del este tipo de vino son de color azul negruzco, y su piel es espesa, la pulpa jugosa con sabor agradable (Señorio de Nevada, 2015).

La uva que produce el vino tinto *Pinot Noir*, es merecida de un trato adecuado para que pueda cultivarse, por esta razón es poco común; sin embargo, debido a su gran sabor se lo sigue produciendo, pues posee un sabor frutal a toronja o fresa, más cítrico que dulce (Fernandez, 2017).

Los vinos también pueden ser clasificados según su contenido de azúcar, donde pueden ser secos, cuando posee menos cantidad de azúcar, hasta dulces cuando la cantidad de azúcar esta alrededor de 50 g/L (Collado, 2001).

En cuanto al vino blanco, su variedad empieza por el *Chardonnay* que es un vino con sabor frutal y cítrico, es popular en Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda (Fernandez, 2017). Por otro lado, está el *Sauvignon Blanc*, este vino es originario de Francia, su sabor es un poco más picante e intenso (Lamas, 2012). La viura o *Macabeo* es una más de las especialidades del vino blanco, este vino tiene un aroma y sabor floral, además su nivel de acidez es más intenso que el de todos los vinos blancos (Fernandez, 2017).

A lo largo de la historia, se han realizado algunos estudios que condujeron al conocimiento de las causas que ocasionaban la transformación del mosto de uva en vino, lo que, desde entonces, ha permitido un avance en la determinación de polifenoles, y su propiedad antioxidante. Es esta propiedad, la que ha sido motivo de estudio y ha permitido desarrollar nuevos temas de análisis, en cuanto al poder anticancerígeno y al efecto inhibidor que retrasa el estrés oxidativo de moléculas (Masis, et al., 2013).

Dentro de los polifenoles que se encuentran en el vino, están los compuestos fenólicos no flavonoides, en donde está el grupo de los estilbenos, haciéndose énfasis en el resveratrol.

### **4.3 RESVERATROL**

Los polifenoles se conocen como compuestos beneficiosos para la salud, ya sea por su acción como antioxidante y por su química; estructuralmente, los fenoles son compuestos orgánicos aromáticos que contienen el grupo hidroxilo como su grupo funcional. Se menciona al polifenol ya que en análisis de vinos estos compuestos son ampliamente estudiados. Los polifenoles conforman una familia muy grande que abarca más compuestos, tales como taninos, flavonoides, etc, sin embargo, al especificar una acción antioxidante en el vino, es el Resveratrol el compuesto que le da esta propiedad. El resveratrol, es un compuesto fenólico categorizado como fitoalexina, es el compuesto responsable de la actividad antioxidante en vinos y zumos de uva (Bustos et al., 2012).

El resveratrol entra en la clasificación de los estilbenos, que forman parte de los no flavonoides (Cenusa, 2016). El resveratrol se encuentra en la piel de las uvas granates o violetas. Los estilbenos, en especial el resveratrol, ha sido de gran interés por su efecto antioxidante, y sobre todo por su poder anticancerígeno al prevenir el envejecimiento celular (Marques, 2014). La actividad antioxidante del resveratrol se debe a las propiedades biológicas que posee, como su capacidad de unirse a

diferentes receptores como el de estrógenos considerándose como un fitoestrógeno. La unión del estrógeno con estos receptores activa la transcripción de los genes que éste regula, por lo tanto, podrían activar genes beneficiosos para la longevidad como los genes antioxidantes (Gambini et al., 2013)

Los efectos benéficos del resveratrol también se dan en el consumo de uvas, tanto como en el vino tinto que se produce a partir de éstas (Marques, 2014). Es por esto que el consumo de vino se asocia con la prevención de trastornos degenerativos como demencia senil, El resveratrol tiene varias propiedades, es antioxidante, antiagregante plaquetario, antiinflamatorio, vasodilatador, e inhibe la proliferación celular (Masis, et al., 2013).

El resveratrol es un compuesto sólido, cristalino soluble en alcohol, que manifiesta propiedades como la inhibición de las lipoproteínas de baja densidad (LDL según sus siglas en inglés) evita la agregación plaquetaria, modula el metabolismo de las grasas e inhibe una enzima implicada en la formación de células tumorales (Villajizan, 2000). Químicamente, es un compuesto fenólico derivado del estilbeno (3,5,4'- trihidroxiestilbeno). En la Figura 1 se muestra la estructura del resveratrol, mientras que la Figura 2 muestra la biosíntesis, que empieza con la biotransformación de la fenilalanina y tiene lugar mediante la condensación de una molécula de cumaril-COA con 3 de malonil-CoA. Esta reacción esta catalizada por la sintetasa, que pertenece a la familia de los estilbenos (Gambini et al., 2013)

En la naturaleza, el resveratrol existe en dos formas isoméricas (configuraciones *cis* y *trans*), en la forma libre, así como en la glucoconjugada  $\beta$ . Los 3-O- $\beta$ -D-glucósidos del resveratrol *cis* y *trans* configurados se llaman *piceides*, la estructura de estos compuestos se las puede observar en la Figura 3 (Polo y Moreno-Arribas, 2008). El *piceida* o conocido en inglés como *piceid*, es un glucósido estilbenoide y es un derivado principal del resveratrol, encontrado comúnmente en los jugos de uva; a este compuesto se los puede aislar de *Fallopia japónica*. Al hablar únicamente del resveratrol, se puede decir que éste se produciría a partir del *piceida*

fermentado por *Aspergillus*, una especie que produce una piceida- $\beta$ -D-glucosidasa. Por otro lado, se tiene al *trans*-piceida, que es el glucósido formado con *trans*-resveratrol, mientras que *cis*-piceida se forma con *cis*-resveratrol (Romero-Peréz., Ibern-Gómez, Lamuela-Raventos y de la Torre-Boronat, 1999)

El resveratrol 3-O-D-glucosido (*piceida*) es el principal componente de la raíz de *Polygonum cuspidatum*, mencionada anteriormente como la *Fallopia japónica*. Este compuesto es utilizado en la medicina popular japonesa y china para el tratamiento de algunas enfermedades cardíacas, incluyendo arterosclerosis e inflamación, de allí también el conocimiento del resveratrol como antioxidante. Los isómeros de *piceida* tienen propiedades similares a las de resveratrol en la inhibición de la agregación plaquetaria y en la inhibición de la oxidación de LDL humana; de una manera menos activa que el *trans*-resveratrol, el *trans*-piceida participa en la reducción de los niveles de lípidos (Romero-Perez, Lamuela-Reventos, WaterHouse y de la Torre-Boronat, 1996).

Entre las características importantes del resveratrol es su estabilidad. En una disolución hidroalcohólica, esta estabilidad depende de la luz, la temperatura y el pH. Dicho esto, se sabe que el resveratrol, exactamente el *trans*-resveratrol es estable durante meses, siempre que esté protegido de la luz, a excepción de que se encuentre a un pH mayor o igual a 10. La radiación desplaza el equilibrio isomérico hacia la formación de la forma *cis*. El isómero *cis*, por otro lado, es estable únicamente en pH neutro o cercano a éste (Cenusa, 2016).

La concentración de resveratrol oscila en vinos tintos entre 0,001 y 10 mg/L, en vinos rosados entre 0,05 y 1,2 mg/L y en blancos desde trazas hasta 0,019 mg/L (Cenusa, 2016).

Para tratar de ubicar el *trans*-resveratrol a nivel celular en las plantas, debe considerarse en primer lugar cómo y por qué se genera esta molécula. Puede deducirse que el *trans*-resveratrol es un anabolito generado en las células de las

plantas con el objeto de cumplir una misión específica, ser un pesticida natural a través del cual y junto con otros anabolitos defiendan a la planta de agresiones externas (Adrian, Rajaei, Jeandet, Vaneau y Bessis, 1998)

Se sabe que el resveratrol es un compuesto que posee interesantes actividades biológicas como efectos antiinflamatorios y actividades sobre el metabolismo de los lípidos (Masis, et al., 2013).

La concentración de *trans*-resveratrol en la piel de la uva depende de diversos factores, reflejados principalmente en: la variedad de uva cultivada, la climatología, el tipo de tierra en la que ha crecido y la época de recolección. Igualmente, se ha detectado la existencia de este compuesto en aquellos vinos cuya fermentación se ha producido con el hollejo (Collado, 2001). Los diversos estudios realizados muestran que la concentración es mayor en los vinos tintos (entre 1,5 y 3 mg/L), y menor en blancos y rosados debido a los procesos de vinificación empleados, más no a que la uva de la que se obtienen sea blanca o rosada.

Se sabe, por información científica bibliográfica y por experimentación, que los polifenoles y puntualmente el resveratrol, tiene un efecto inhibitor sobre el crecimiento de las células cancerosas. Estudios confirman que existía menor influencia de desarrollar cáncer, en personas que consumían medio litro de vino al día, en comparación con los grandes bebedores o los abstemios (Villajizan, 2000).

Si bebemos diariamente con moderación vino rico en polifenoles, nos beneficiamos del efecto antioxidante de los flavonoides y de la protección contra la aparición del cáncer. Sin embargo, el fenómeno se invierte cuando la cantidad de alcohol aumenta, ya que la acción de los polifenoles se muestra ineficaz para contener la formación de radicales libres, dado al exceso de alcohol (Villajizan, 2000).

#### **4.4 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN Y PREPARATIVAS**

Para la determinación de resveratrol, de acuerdo a la técnica que se vaya a utilizar, ya sea para identificar o cuantificar, se deben realizar ciertos pasos previos, es decir, una preparación de la muestra, que, dependiendo el caso, va a optimizar los resultados que se obtengan.

De acuerdo a la gran mayoría de autores, como Lee y Rennaker (2007), las muestras deben ser filtradas a través de un filtro Millipore de 0,45  $\mu\text{m}$ , pues es importante mencionar que las muestras se deben colocar en viales ámbar, ya que se debe proteger de la luz para no causar la isomerización, es decir, el paso de *trans*-resveratrol a *cis*-resveratrol. Posterior a esto, la muestra ya podría ser inyectada en el cromatógrafo (Lee y Rennaker, 2007).

Debido a la especificidad de la detección de masas (MS), un pico de *trans*-resveratrol podría ser detectado después de una simple filtración y dilución, de acuerdo a lo que sería la preparación de la muestra (Young et al., 2016).

Según un análisis realizado por Montero (2001), la mayoría de métodos que se emplean en la determinación de resveratrol, utilizan la extracción en fase sólida (SPE según sus siglas en inglés), tanto para cromatografía de masas (GC según sus siglas en inglés) como para cromatografía líquida de alta resolución (HPLC según sus siglas en inglés) con fase normal. Estos métodos combinan esta extracción con la derivatización con bistrimetilsilano-trifluoracetamida (BSTFA) para así poder realizar el análisis por GC, principalmente (Montero, 2001). Por otro lado, la inyección directa es aplicada en HPLC con fase reversa, lo que facilita también el estudio de otros polifenoles. Un 9 % del total requiere de métodos de filtración previos a la inyección directa en HPLC, ya sea trabajando en fase reversa o con fase normal, como en el ensayo realizado por Lee y Rennaker (2007); los filtros que más se utilizan son de poli(tetrafluoroetileno) (PTFE) de 0,45  $\mu\text{m}$  (Lee y Rennaker, 2007). La extracción líquido-líquido seguido de derivatización podría llegar a representar alrededor del 20 % de los métodos químicos analíticos; este tipo de extracción se utiliza comúnmente

para aplicarlos con el análisis por cromatografía de gases acoplado a masas (Ertan, Vural y Kizilet, 2012).

La derivatización es un proceso donde se da una transformación química irreversible, que en particular es la formación de complejos. Aquí se modifica químicamente el analito para detectarlo o separarlo con mayor facilidad. Si se analiza por HPLC, los productos se detectan fácilmente por su fuerte absorbancia en el UV a 360 nm (Harris, 2007). En la derivatización, un hidrógeno activo es reemplazado por grupo alquilsilil como por ejemplo el trimetilsilil (TMS); este agente derivatizante es capaz de derivatizar grupos  $-OH$ , de ácidos y alcoholes. Comparando con el compuesto de partida, los silil derivados son mucho más volátiles, menos polares, y más estables térmicamente, ideales para el análisis por GC (Pindado et al., 2006)

Así también se suele utilizar métodos de micro extracción en fase sólida (SPME según sus siglas en inglés) y la extracción con fluido supercrítico (SFE según sus siglas en inglés), en lo que se refiere a polifenoles en general, donde adyacentemente se determinaría el resveratrol. Entre las razones principales para la utilización de la micro extracción mediante un sorbente empaquetado, está lograr una limpieza óptima a la muestra, liberándola así de impurezas, ya que los compuestos que no están retenidos en el sorbente se eliminan de la muestra final, como muestra la Figura 4, de otro modo podrían aparecer como picos de interferencia en los cromatogramas de cromatografía líquida de alta resolución. Esta técnica puede ser eficaz para detectar y cuantificar adecuadamente el analito, ya que, si el analito se encuentra en niveles bajos de concentración en una muestra en particular, la micro extracción solucionaría la posterior identificación debido a la pre-concentración de sorbente empaquetado. De acuerdo a los estudios analizados en el presente trabajo, se utiliza hidruro de sílice como sorbente en los cartuchos de la micro extracción para la posterior pre-concentración. Se sabe que los grupos silanol producen efectos indeseables en HPLC ya que el grupo Si-H en el empaquetado de la columna es relativamente no polar, lo que puede impartir diferencias en la hidrofobicidad entre los dos materiales. Estos

tipos de diferencias se traducen en ventajas para la eficiencia de extracción o en la capacidad de eliminar los contaminantes de la muestra (Young et al., 2016).

Para la preparación de muestra referente al *cis*-resveratrol, se utiliza un estándar de *trans*-resveratrol en la mayoría de los casos y se somete a radiación UV artificial o a la luz del sol; después de 10 min de exposición, el 80 – 90 % de *trans*-resveratrol se convierte en *cis*-resveratrol (Romero-Perez et al., 1996)

En cuanto a la preparación de muestra, también se puede decir que depende del tipo de muestra con la que se trabaja, un ejemplo que se puede utilizar es el vino tinto (*Merlot* de California), que fue únicamente diluido al 3:1 en etanol al 12 % en agua, y fue analizado de esta manera agregando un nivel conocido de *trans*-resveratrol (Stenerson, 2017).

Según Montero (2001), al analizar y contrastar las diferentes técnicas de extracción, se han encontrado desventajas, expuestas en la Tabla 1 (Montero, 2001).

#### **4.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS**

Los compuestos fenólicos constan de un anillo bencénico que contiene uno o diversos grupos hidroxilo. Según su estructura química, se puede decir que se encuentran divididos en flavonoides o no flavonoides. Se caracterizan por un esqueleto de 2 anillos bencénicos unidos por una cadena de 3 átomos de carbono ciclada en un heterociclo oxigenado. Según esta estructura, el resveratrol pertenece a los estilbenos que son compuestos no flavonoides, y sigue teniendo las características de un polifenol (Valls, Lampreave, Nadal y Arola, 2000).

Entre las técnicas más estudiadas para la determinación o identificación de resveratrol está la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que en la actualidad es el método más empleado para el análisis cuantitativo de *trans*-resveratrol, sin embargo, requiere de etapas previas de extracción antes de la



separación en el cromatógrafo (Montero, 2001). Es importante mencionar que la técnica desarrollada por HPLC, puede darse utilizando diferentes detectores, entre los más significantes está el UV (ultravioleta-visible) y el MS (masas), así también se ha utilizado la cromatografía líquida con espectro de masas/masas (LC-MS/MS) y la cromatografía de gases acoplada a masas GC-MS.

De acuerdo a Montero (2001) y los estudios realizados previamente, se puede decir que los métodos más relevantes sobre análisis de *trans*-resveratrol en piel de uva y vinos, son llevados a cabo empleando como técnica la cromatografía de líquidos de alta resolución, así también se trabaja con cromatografía de gases, sin embargo se la utiliza con menos frecuencia por los costos de equipo y por el tratamiento de muestra que este método implica, también se ha empleado la electroforesis capilar, sin embargo sigue siendo un método en prueba (Montero, 2001).

Uno de los métodos analíticos empleados en el análisis de *trans*-resveratrol es la Cromatografía de Gases (GC), utilizando bis-(trimetilsilano) trifluoracetamida para aumentar su volatilidad. De acuerdo a los resultados que se observaron en la utilización de este método, se puede decir que proporciona límites de detección por debajo de los ppm, sin embargo, los procesos de extracción y derivatización requieren más tiempo y suelen provocar isomerización del *trans*-resveratrol en *cis*-resveratrol (Montero, 2001).

Según Montero (2001) se han desarrollado métodos que permiten un análisis más rápido y directo con gran sensibilidad de compuestos no volátiles. El método descrito se basa en la desorción laser (LD según sus siglas en inglés) acoplada a la espectroscopia de ionización multitónica resonante (REMPI según sus siglas en inglés) y la espectroscopia de masas por tiempo de vuelo (TOFMS según sus siglas en inglés) (Montero, 2001).

#### **4.5.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN**

Se conoce a la cromatografía líquida de alta eficacia o alta resolución como HPLC. Esta es una técnica que permite una mejor separación de compuestos y se basa en la diferencia de afinidad de los analitos por la fase estacionaria, es decir, es un proceso donde una variedad de fuerzas compiten de manera diferenciada por cada especie química, bien fijándola en la fase estacionaria, o arrastrándola con la fase móvil (Ruiz, 2003), utilizando una presión elevada para forzar al disolvente a que pase por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución (Sierra, et al., 2010).

Es importante considerar que la técnica de HPLC varía de acuerdo a condiciones como la temperatura, presión y fase móvil que se utilice. HPLC se puede utilizar como técnica preparativa y como técnica analítica. En este caso de identificación de resveratrol deja de ser una técnica preparativa, es por esto que se utilizan otras técnicas de separación para permitir la purificación y cuantificación de este analito. En esta técnica, la fase móvil eluye de la columna durante un tiempo determinado, conteniendo cantidades muy diferentes de solutos que pasan a través de un sistema de detección, y representa la señal obtenida frente al tiempo o al volumen de elución; al gráfico obtenido se le conoce como cromatograma. Los solutos se representan gráficamente como picos y se los identifica por su anchura, altura y área (Hernández, 2005)

El principio de la HPLC de fase reversa (RP-HPLC según sus siglas en inglés), consiste en que el componente más polar es el primero en eluir, y al aumentar la polaridad de la fase móvil, el tiempo de elución también aumenta (Sierra, Perez, Gómez y Morante, 2010). En sí, la técnica de HPLC sirve para la separación de compuestos orgánicos de diferentes matrices; con esta técnica se ha podido desarrollar la investigación de diferentes matrices y sus componentes tales como frutas, verduras, fluidos biológicos; por otro lado, en el ámbito ambiental se ha desarrollado análisis de aire y sus contaminantes, es por eso que esta técnica es de gran utilidad. Sin embargo, HPLC mejora cuando se acoplan a otras técnicas de detección. La técnica de HPLC es la más común debido a que ésta es rápida,

reproducibile, confiable y no necesita gran cantidad de analito en comparación con técnicas clásicas (Bustos et al., 2012)

En la determinación de resveratrol en vinos se utiliza HPLC debido a la capacidad de identificación de estilbeno libre. En ésta técnica se utiliza una inyección directa (Lee y Rennaker, 2007), lo cual implica menor tiempo en preparación de la muestra; así como el tiempo que tarda en eluir el analito no es demasiado largo, siendo estos dos factores una ventaja de la técnica, lo que se afirma con el análisis realizado por Salazar et al. (2011) en muestras de vino peruanos (Salazar, Espinoza, Ruiz y Rojas, 2011).

En HPLC se pueden emplear diferentes detectores, ya sea fotodetector de absorción *UV-vis* o espectrofotómetro de *arreglo de diodos* (DAD según sus siglas en inglés), la interpretación de los espectros varía ligeramente, por lo que Bustos et. al, (2012) tomaron en cuenta ambos casos haciendo uso de dos diferentes equipos de HPLC: Agilent (con detector DAD) y Perkin Elmer (con detector UV-Vis). 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 se evita el trabajo de realizar adición estándar para la identificación de picos, ahorrando tiempo y material de análisis (Bustos et al., 2012)

La preparación de la muestra va a depender mucho del detector que se vaya a utilizar. En cuanto al análisis por HPLC con detector de fluorescencia, las muestras se preparan con extracción en fase solida con cartuchos, donde en primer lugar se acondicionan los cartuchos con 4 mL de metanol y con 4 mL de agua, posterior a esto, se introducen 5 mL de vino en la columna el cartucho, se seca con corriente de gas nitrógeno y los compuestos se eluyen con 3 mL de metanol, esto se inyecta en HPLC después de filtrar (Rodríguez, González, García y Pérez, 2001).

Los vinos rosados que se analizaron por HPLC, según la literatura, únicamente pasaron por el proceso de filtración y luego se realizó inyección directa; y por el mismo procedimiento descrito se trabajó con los vinos tintos (Romero-Perez et al., 1996).

Para la cuantificación de niveles bajos de la forma *cis* en algunos vinos, se requirió de una etapa de aumento de concentración a la muestra; donde 10 mL se concentraron hasta 1 mL mediante evaporación rotatoria a una temperatura de 30 °C y el concentrado se filtró (Romero-Perez et al., 1996).

Los resultados obtenidos en HPLC, se basan en el detector utilizado. Los detectores empleados van a proporcionar resultados comparables, pero se podrá realizar una comparación en cuanto a eficiencia, tomando en cuenta factores como, tiempo de análisis y picos identificados en el cromatograma (Ruiz, 2003).

- **DETECTOR UV-VIS**

Al trabajar con UV se debe tener en cuenta las longitudes de onda de los analitos a determinar. En la experimentación realizada por la mayoría de autores mencionados en este trabajo, se trabajó con una longitud de onda de 306 nm para el *trans*-resveratrol y a 286 nm para el *cis*- resveratrol. Al hablar de vino blanco y vino rosado, se habla de bajas concentraciones de resveratrol, por lo que se necesita una derivatización para aumentar la concentración, la derivatización de la cual se habló en las técnicas preparativas según Harris (2007). De acuerdo al análisis realizado por Romero-Perez et al. (1996), en donde se utiliza detector UV para el análisis en muestras de vino blanco y rosa se obtienen un coeficiente de correlación de 0,997 de acuerdo a la concentración de resveratrol, con resultados óptimos, pudiendo establecer valores de *trans*, *cis* y *piceida* resveratrol (Romero-Perez et al., 1996).

En esta técnica se trabajó en modo gradiente y utilizando 90 % agua destilada, 10 % de acetonitrilo y 0,1 % de ácido fórmico, esto para el disolvente A, en cuanto al

disolvente B se utilizó ácido fórmico al 0,1 % con acetonitrilo (v/v). El programa de gradiente se mantuvo a 100 % de A durante 2 min, disminuyó linealmente hasta 50 % de A en 7 min, y aumentó linealmente hasta 100 % de A en 1 min (Young et al., 2016).

Por otro lado, se aplicó un método de gradiente multietapas utilizando metanol - agua - ácido acético (10: 90: 1, v/v) como disolvente A y se mezcló con metanol - agua - ácido acético (90: 10: 1, v/v) como disolvente B (Young et al., 2016).

Los picos cromatográficos fueron identificados comparando las retenciones y los espectros UV y MS de las muestras con los de los compuestos estándar. La cuantificación se llevó a cabo por estandarización externa (Mark, Nikfardjam, Avar y Ohmacht, 2005)

De acuerdo con Mark et al. (2005), en su ensayo, donde se desarrolla un método y se lo valida, no solo para *trans*-resveratrol, sino también para *piceida*, se utiliza HPLC isocrática de fase inversa. Aquí, el método desarrollado no necesita preparación de la muestra ni una separación previa. Los resultados mostraron que la técnica es muy sensible, obteniéndose límites de detección entre 0,2 y 0,9  $\mu\text{mol}$ , además, se confirmó que es un método reproducible y preciso. La sensibilidad puede aumentarse adicionalmente usando la detección de MS. En este ensayo en particular, más de 70 muestras de la región vinícola de Villany (sur de Hungría) fueron examinados para identificar el *trans*-resveratrol y *trans*-piceida (Mark et al., 2005).

Así mismo, según Trela y Waterhouse (1996), también se trabajó a las mismas longitudes de onda, siendo estas a 306 y 286 nm, el tiempo de elución fue de 7,3 min para el *trans*-resveratrol, además, se compararon los picos con el estándar y mostraron ser idénticos, en el ensayo realizado por Trela y Waterhouse (1996) se obtuvo un pico B a un tiempo de retención de 8 min, y se formó después de una breve irradiación, correspondiente al *cis*-resveratrol (Trela y Waterhouse, 1996).

Normalmente, para cualquier estudio de algún analito, se realiza una curva de calibración y de esta forma se mide la linealidad y confiabilidad del análisis. La detección se midió como la concentración correspondiente a la señal más baja medible sobre la línea base con una relación señal/ruido de 3:1 y se realizó por triplicado. Los límites de detección obtenidos se muestran en la Tabla 2. La precisión del instrumento se evaluó realizando 10 inyecciones repetidas de un estándar de *trans*-resveratrol de 22,1  $\mu\text{mol/L}$ . Los coeficientes de variación fueron de 1,4 % y 1,7 % a 306 y 286 nm, respectivamente, lo cual indica una muy alta reproducibilidad (Trela y Waterhouse, 1996).

#### • DETECTOR DE MASAS

De acuerdo con Vlase et al. (2009), el espectrómetro de masas funcionó bajo una ionización química de presión atmosférica (APCI según sus siglas en inglés) en modo negativo. Se utilizó nitrógeno como gas nebulizador. El calentador APCI se ajustó a 350 °C, la presión del nebulizador fue de 60 psi, el flujo de gas seco fue de 5 L/min, posterior a esto se calentó a 250 °C. Se fijó para supervisar la transición  $m/z$  227  $m/z$  185 y para la adquisición de datos se utilizó el software Chemstation, Versión B.01.03 y LC = MSD Trap Control (Bruker Daltonik, GmbH, Brehmen, Alemania), versión 5.3. En cuanto a resultados se puede decir que las transiciones de iones monitoreadas fueron  $m/z$  229  $\rightarrow$  134,9 y  $m/z$  227  $\rightarrow$  184.7 para los modos de ionización positiva y negativa, respectivamente (Vlase, Kiss, Leucuta y Gocan, 2009).

Al utilizar detector de masas, se obtiene la información de espectros de masas donde se da la relación masa-carga,  $m/z$ , del ion molecular e ión fragmentado, obtenido de bibliotecas espectrales (Lee y Rennaker, 2007).

Los espectros de masa, comparan los iones madre ( $m/z$  227) e iones fragmentados ( $m/z$  185 y 159) de acuerdo a los estándares comprados y sintetizados.

Al estudiar los vinos de Idaho, según Lee y Rennaker (2007) donde se trabaja con HPLC-MS, las muestras de vino tinto, el *Merlot* y *Cabernet Sauvignon* presentaron más cantidad de estilbenos, por consiguiente, mayor concentración de resveratrol, lo que se explica al hablar de la vinificación de cada uno de estos vinos, al tener mayor tiempo de contacto con la piel de uva en la elaboración los niveles de resveratrol aumentan, ya que estos se concentran en la piel de la uva (Prez y de Rincon, 2000).

En lo que refiere al análisis con detector de masas, según Vlase et al. (2009), el sistema se utiliza con una fuente de electrospray de doble rociador (ESI según sus siglas en inglés), usando el modo de ionización positiva, donde se detectó *trans*-resveratrol como el ion  $[M + H]^+$  ( $m/z = 229,0859$ ) (Vlase et al., 2009).

#### • DETECTOR DE FLUORESCENCIA

El detector fluorescente permite cuantificar el compuesto después de una etapa de pre-concentración usando un cartucho de extracción de fase sólida C18, por lo que, se puede decir que este método es más selectivo y sensible por la etapa de pre-concentración. Con el detector de fluorescencia se trabaja a un  $\lambda$  de excitación de 360 nm y un  $\lambda$  de emisión de 374 nm (Rodríguez et al, 2001). Los espectros obtenidos mediante el uso de detectores de absorbancia y de fluorescencia se puede observar en la Figura 5.

La desviación estándar con el detector de fluorescencia fue de 1,23 mg/L y con el detector UV fue 1,09 mg/L, al analizar un total de 49 muestras. Para comparar ambos métodos se realizó una prueba t, donde no existe diferencia significativa de detección a un nivel de confianza del 95 %  $p = 0,507$ . El contenido de resveratrol fue entre 1,7 y 4,2 mg/L; en este estudio realizado por Rodríguez et al. (2001) no se tiene un dato específico para la concentración de resveratrol, ya que alrededor de 5 muestras de vino tinto diferentes fueron analizadas, y los datos obtenidos fueron analizados de acuerdo al valor medio que fue de 2,9 mg/L; expuesto en la Tabla 3.

Así también se realizó un estudio de varianza ANOVA, el cual permitió comprobar que no había diferencia significativa en el contenido del resveratrol de las muestras de vino analizadas, trabajando bajo un nivel de significación del 95 % (Rodríguez et al., 2001).

En cuanto a los resultados obtenidos basados en los solventes utilizados para la elución se puede decir que el disolvente de agua desionizada al 100 % muestra una recuperación más baja, ya que el *trans*-resveratrol está fuertemente retenido en el cartucho en estas condiciones. Cuando el 15 % de acetonitrilo está presente, se observa un aumento significativo a 55,0 % de recuperación, esto se debe a la baja solubilidad del resveratrol en agua, por que necesariamente se requiere de acetonitrilo para permitir así la disolución completa. “Si el contenido de agua es demasiado bajo, la adsorción cuantitativa de resveratrol sobre el sorbente puede no ser alcanzada, llevando a una menor recuperación” (Young et al., 2016).

En todo análisis, la elección del disolvente de elución es importante, ya que es una manera de asegurar que el analito se desorba cuantitativamente, es por esto que la composición del disolvente de elución debe consistir de al menos 60 % de disolvente fuerte e idealmente 100 %. En la mayoría de estudios realizados se utiliza el acetonitrilo, sobre todo cuando se habla de HPLC en fase inversa, así también se habla del uso de metanol o propanol y el disolvente débil es agua, como se muestra en la Tabla 4. Según Young . et al. (2016) la utilización de metanol puro permite una mayor recuperación casi del 99,8 % (Young et al.,2016).

Las concentraciones obtenidas en los diferentes trabajos aquí propuestos se muestran en la Tabla 3, en ciertos datos se observa un rango de concentración y no un valor fijo de *trans*-resveratrol, este rango está determinado debido a que en cada ensayo se analizaron distintas muestras de vino, ya sea por región, y no se obtiene un dato unico. Sin embargo, estos rangos están dentro de lo establecido como promedio de resveratrol que sería alrededor de 10 mg/L como valor máximo según la literatura. (Cenusa, 2016).



## • IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Mediante HPLC con detector UV-Vis, se logró cuantificar los estilbenos, puntualmente el *trans*-resveratrol. Cuando se trabaja con detector UV, las asignaciones máximas se realizan de acuerdo con los espectros UV-visibles comparando tiempo de retención, o cromatogramas de acuerdo con estándares auténticos. Así también, al trabajar con espectroscopia UV-Vis o DAD, se debe decir que la determinación del *trans* y *cis*-resveratrol en muestras de vino se determinan comparando los tiempos de retención, cuando se trata únicamente de identificación de compuesto (Lee y Rennaker, 2007).

Las señales emitidas por el resveratrol pueden ser identificadas directamente del espectro obtenido mediante HPLC, y se observa el espectro UV-Vis de cada componente separado. Si únicamente se tiene un detector UV-Vis, el resveratrol presente en los vinos se identifica por comparación con el tiempo de retención del patrón, lo que sucede también con arreglo de diodos (DAD). Al comparar estos dos modos de detección se debe mencionar que en HPLC/UV/Vis, se utiliza 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 asegurar los resultados (Bustos et al., 2012).

En el trabajo desarrollado por Rodríguez et al. (2001), el límite de detección encontrado con el detector de fluorescencia fue de 0,003 mg/L, considerando como límite de detección la concentración de analito que da una señal igual a tres veces el valor del blanco. La precisión se calculó usando las líneas de regresión para los estándares. En este trabajo se habla sobre la utilidad del método, el cual por análisis de rutina se comprobaría después de 200 inyecciones. Así también, no se producen interferencias al comparar el perfil del vino tinto y de la muestra dopada con el estándar, el tiempo de este análisis tardó más de lo habitual en comparación con los otros trabajos aquí descritos, el tiempo fue de 24 minutos para la elución de un pico,

de acuerdo a lo que se observa en la Figura 5 que en comparación con la utilización de otros detectores como el de masas y con la bibliografía excede el tiempo de análisis (Rodríguez et al., 2001).

#### 4.5.2 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADO A MASAS

Se ha demostrado que la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) es una poderosa herramienta capaz de detectar *trans*-resveratrol hasta 0,3  $\mu\text{mol}$  y también puede diferenciarse basándose en la relación masa-carga ( $m/z$ ) (Careri et al., 2004)

Normalmente, en las experimentaciones acopladas a masa, se trabaja en modo gradiente, según Careri et al. (2004) el programa de gradiente se mantuvo a 90 % de A durante 2 min, disminuyó linealmente hasta 40 % de A en 16 min y aumentó linealmente de nuevo hasta 90 % de A en 2 min; donde el solvente A fue agua destilada 90 %, 10 % de acetonitrilo y 0,1 % de ácido fórmico (Careri et al., 2004).

Refiriendo a Young et al. (2016) se puede decir que al trabajar con un detector de masas se debe cuidar mucho la temperatura de la fuente de iones, puesto que puede ocurrir una fragmentación indeseada e incontrolada, esto a su vez, daría lugar a una regeneración de algunos iones moleculares característicos del resveratrol libre. Este fenómeno se conoce como disociación inducida por colisión (CID según sus siglas en inglés) y ocurre con frecuencia en los casos de moléculas que contiene enlaces químicos lábiles (Young et al., 2016)

Una vez conocido este suceso, se puede decir que después de la fragmentación de la trampa de iones, un nuevo pico puede ocurrir debido a los mismos fragmentos característicos del *trans*-resveratrol.

En cuanto a resultados obtenidos de acuerdo a los diferentes tiempos de retención, el primer pico se dio a los 2,2 min y éste correspondía al ion de transición  $m/z$  229  $\rightarrow$  134,9 del *trans*-resveratrol libre protonado de la muestra de vino analizada, por otro lado, estaba el pico a los 2,45 min, correspondiente a la misma transición, pero del *trans*-resveratrol libre protonado generado por la forma esterificada del analito (Vlase et al., 2009).

Cabe recalcar que existieron algunos problemas en el análisis realizado por Lee y Rennaker (2007), donde un par de muestras, una de vino *Cabernet Sauvignon* y una muestra de *Merlot* no tenían un nivel detectable de *trans*-resveratrol, este tipo de problemas suelen suceder, es por eso que se utilizan varias muestras además de un número considerable de repeticiones, para asegurar resultados. A pesar de esto se determinó que los demás vinos *Cabernet Sauvignon* tenía más *cis*-piceida y lo contrario se observó con las muestras de vino *Merlot*, las cuales tenían mayor cantidad de *trans*-piceida (Lee y Rennaker, 2007).

Al hablar del pico para *trans*-resveratrol de la micro extracción de vino tinto por extracción con sorbente empaquetado, de acuerdo a lo que se habló anteriormente, al usar el sorbente de hidruro de sílice C18 se obtuvo una concentración de 0,64 ppm en la muestra final. Contabilizando el doble de la concentración a través de la micro-extracción por sorbente empaquetado, se calculó que la concentración original de *trans*-resveratrol en la muestra de vino era de 0,32 ppm (Young et al., 2016).

En el ensayo realizado por Mark et al.(2005), donde se trabaja con LC-MS, el límite de detección (LOD) fue muy bajo. Utilizando la detección UV, el LOD fue 0.9  $\mu$ mol para *trans*-resveratrol y 0,6  $\mu$ mol para *piceida*. Usando la detección de MS, el LOD fue aún más bajo, a 0,3  $\mu$ mol y 0,2  $\mu$ mol, respectivamente (Mark et al., 2005). En la Tabla 2 se puede comparar estos valores de LOD, sobre todo los de *trans*-resveratrol, de acuerdo con otras técnicas ya mencionadas.

### 4.5.3 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A MASAS

La cromatografía de gases, igual que el resto de técnicas cromatográficas, se utiliza para la separación de compuestos en determinada matriz, con la única diferencia que en este caso la fase móvil es un gas inerte. En este tipo de cromatografía se utiliza una columna conocida como “columna capilar”, por el diámetro que ésta posee. La aplicación de la cromatografía de gases es amplia, y puede darse para realizar análisis de control de calidad de productos (UNAM, 2007).

La cromatografía de gases también se puede utilizar con un detector de masa para medir *trans* y *cis*-resveratrol. Al utilizar esta metodología se optimizan los resultados, así también los datos se obtienen por monitorización selectiva de iones (SIM según sus siglas en inglés) del ion molecular en la masa. Se puede decir que mediante este método se pueden identificar otros componentes fenólicos. Con respecto a la cuantificación y resolución, se realiza con curvas de calibración lineal en un amplio rango. El objetivo del trabajo realizado por Ertan, et al., (2012), fue determinar compuestos fenólicos biológicamente importantes (ácido *p*-cumárico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido cafeíco, *trans*-resveratrol, quercetina, catequina y epicatequina) de una muestra de vino tinto turco utilizando cromatografía de gases con espectrometría de masas detección en el modo de monitorización de iones selectivos, así también confirma que en los últimos años, la monitorización selectiva de iones GC / MS (SIM) para la determinación cuantitativa de compuestos fenólicos han atraído el interés de los científicos (Ertan, et al., 2012).

En cuanto a la preparación de muestra, basándose en el artículo de Stenerson (2017), se indica que la fibra de poliacrilato es adecuada para la extracción de compuestos polares semi-volátiles y que es más resistente al hinchamiento que otros tipos de fibras, por esta razón, en la experimentación se elige este tipo de fibra para optimizar la extracción. La fibra se inserta en un vial de 4 mL que contenía 5 µL de reactivo Sylon™-BFT (BSTFA + 1 % TMCS), por su nombre IUPAC en inglés N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide + Trimethylchlorosilane. Por consistencia, se deja

equilibrar el vial que contenga el Sylon-BFT durante 60 - 90 minutos antes de ser usado, para cada extracción se utiliza un nuevo vial, posterior a esto se llevó a una temperatura de 280°C durante 2 minutos, directamente en el puerto de inyección de GC-MS. El procedimiento de derivatización dio como resultado la sililación de los tres grupos -OH presentes en el resveratrol. El derivado resultante tiene un peso molecular de 444 g/mol, y el posterior análisis de GC-MS mostró un predominio del ion molecular, que se utilizó para la cuantificación (Stenerson, 2017).

Como ya se ha mencionado anteriormente, en las técnicas de preparación de muestra, la SPME cuando se utiliza junto con una derivatización en fibra, muestra ser indicada para la extracción de resveratrol en vino tinto. De igual manera, se encontró que la técnica es altamente sensible, simple y cuantitativa (Stenerson, 2017).

De acuerdo a los resultados obtenidos por Stenerson (2017), se detectó un pico de *cis*-resveratrol en las muestras de vino, con lo cual se debe mencionar que la forma *cis* no se encuentra naturalmente en las uvas, sin embargo, se ha teorizado que puede formarse a partir de la *trans* durante el análisis, por isomerización, así también puede darse por la producción y/o el envejecimiento de la muestra (Stenerson, 2017).

#### **4.5.4 CROMATOGRAFÍA LIQUIDA ACOPLADO A MASAS/MASAS CON IONIZACIÓN EN ELECTROSPRAY**

En cuanto a esta técnica según sus autores Vlase et al. (2009), se manejó mediante espectrometría de masas con ionización en electrospray como método de identificación y confirmación. La experimentación se llevó a cabo mediante modo isocrático. Como fase móvil se utilizó ácido fórmico, acetonitrilo y propanol. Entre otros aspectos de este método están los gases utilizados, donde se trabajó como gas nebulizante con Nitrogeno de alta pureza. Se utilizó un estándar de *trans*-resveratrol como en todos los métodos anteriormente descritos, para realizar la comparación de picos y de tiempos de retención. Se realizaron análisis de LC-MS de exploración completa en positivo (PI según sus siglas en inglés) y de iones negativos (NI según

sus siglas en inglés). Estos parámetros incluyeron fuentes de iones, ya sea ionización química a presión atmosférica (APCI según sus siglas en inglés) o ionización por electrospray (ESI según sus siglas en inglés), ambos operados en modo de ionización positiva y negativa, controlando el porcentaje de fase acuosa y orgánica, el tipo de disolvente orgánico y concentración de aditivos. Las condiciones óptimas fueron las siguientes: una fase móvil consistente en una mezcla de acetato de amonio/acetoneitrilo con un caudal de 1 mL/min, detección MS/MS con una interfaz APCI, operada en modo de ionización negativa. La transición de iones monitorizada fue  $m/z$  227  $\rightarrow$  184,7. Además, se generaron curvas de calibración para ambos isómeros de resveratrol en el intervalo de 10,47 - 837,86 ng/mL para el isómero *trans* y 9,12 - 730,14 ng/mL para el isómero *cis* (Vlase et al., 2009).

Según otros estudios realizados por Bernard y Kussmann (2010), donde se utiliza el mismo método, los resultados fueron similares al trabajar en modo PI y NI. El espectro que se obtuvo mostró la formación exclusiva a  $m/z$  227, y ciertos fragmentos del ion  $MS^2$  en  $m/z$  185 y fragmentos  $MS^3$  del ion  $m/z$  185 a  $m/z$  183,157 y 143. Aquí se explica que estos patrones de fragmentación, se consideran como restos de fenol y resorcinol. Y se confirma que LC-ESI-MS en el modo NI puede ser aplicado y apropiado para la determinación de resveratrol en vino (Bernard y Kussmann, 2010).

En lo que se refiere a la preparación de la muestra para el método de LC-MS/MS, alrededor de 1 g de muestra fue liofilizada, y se extrajo con 25 mL de una mezcla de metanol/etanol (8:2, v / v), además se sometió a ultrasonificación durante 15 min y agitación durante 12 horas a temperatura ambiente (Careri et al., 2004).

Para la cuantificación del *trans*-resveratrol en vino tinto, se realizó una curva de calibración en el rango de 6-600  $\mu$ g/L. El análisis cuantitativo de *cis*-resveratrol se realizó utilizando la curva de calibración del *trans*-resveratrol por ionización análoga y factor de respuesta similar. La linealidad del método LC-MS/MS se estudió en el rango 6-6000  $\mu$ g/L, además se ejecutó una prueba t para verificar la importancia del intercepto (nivel de confianza) 95 %. La precisión se calculó sobre la matriz en

términos de repetición como desviación estándar relativa (RSD%) a dos concentraciones. El intervalo de confianza (IC) también se calculó a un nivel de confianza del 95 % (Careri et al., 2004).

La Figura 6, muestra un espectro de masas típico de exploración completa de *trans*-resveratrol indicando la transición 229→134,9 obtenida mediante la fragmentación del ion molecular protonado  $m/z$  229 (Vlase et al., 2009). La Figura 7, por otro lado, presenta el espectro de exploración completo del mismo analito, pero en modo de ionización negativa y también un espectro de MS/MS que indica la transición 227 →184,7, correspondiente a la fragmentación (Vlase et al., 2009).

En APCI, el uso de metanol en lugar de acetonitrilo produjo un aumento de sensibilidad de detección, pero también se considera que aumenta la estabilidad de la señal del analito. De acuerdo a lo mencionado anteriormente, acerca de la solubilidad del analito, en este caso resveratrol, y lo que muestra la Tabla 4, tanto el metanol como el acetonitrilo son buenos solventes. Sin embargo, el metanol puede llegar a ser mejor que el acetonitrilo, y se debe a que el acetonitrilo en fase gaseosa es una base relativamente fuerte, por lo tanto, aparece como una competencia entre los analitos para la protonación. En el caso de APCI, en modo ionización positiva, la mayor relación señal/ruido obtenida con metanol como componente de la fase móvil se podría explicar por el carácter prótico de este disolvente. Así también, dado que en el caso del APCI la ionización tiene lugar en fase gaseosa, otro aspecto importante podría ser el mayor contenido de componente orgánico en el caso de la fase móvil con metanol, lo cual favorecería la evaporación más rápida de la fase líquida (Vlase et al., 2009).

Por otro lado, al hablar del método donde se utiliza ESI (modo de ionización electrospray), el uso de acetonitrilo resulta con una sensibilidad ligeramente mayor en comparación con los resultados obtenidos con metanol. En el caso de LC-MS/MS, según Careri et al. (2004) cuando se usan aditivos en la fase móvil, es importante

utilizar una concentración de buffer tan baja como sea posible: máximo 10 mM en ESI y por debajo de 100 mM en LC-MS/MS (Careri et al., 2004).

Las relaciones señal/ ruido (S/N según sus siglas en inglés) obtenidas en los estudios realizados por Vlase, et al. (2009) muestran que independientemente de la interfaz de MS y del modo de ionización positiva o negativa, una disminución significativa de S/N se observó a medida que aumentaba la concentración de acetato de amonio. La presencia de acetato de amonio en la fase móvil aumentó la sensibilidad en el modo de ionización negativo, con señal significativamente menor a los valores de la relación de ruido para la ionización positiva probado solo con APCI. En base a los resultados obtenidos, el ácido acético mostró resultados superiores que el ácido fórmico cuando se usó para acidificar la fase móvil (pH <7). Estas diferencias fueron más evidentes en el caso de modo de ionización negativa, independientemente de la interfaz utilizada ya sea ESI o APCI. Una posible explicación es que el ácido acético es un compuesto volátil y un ácido más débil que el ácido fórmico (Vlase et al., 2009).

El efecto matriz podría ser explicado en base a los compuestos coeluidos presentes en la muestra compleja, dando lugar a errores proporcionales sistemáticos debido a una ionización competitiva en el proceso ESI y en disminución de la intensidad de la señal proporcional a la concentración del analito. Para superar el efecto matriz y evitar el tiempo de purificación de muestras, la muestra de vino tinto se diluyó 4 y 10 veces. En las muestras de vino tinto, además del pico correspondiente a *trans*-resveratrol, los cromatogramas MS/MS mostraron la presencia de otros tres picos a los tiempos de retención de 5,80, 8,13, y 17,96 min. Según Careri (2004), el pico a los 17,96 min se atribuyó al *cis*-resveratrol, esto debido a la naturaleza más hidrófoba del isómero *cis* en una posición invertida en comparación con el *trans*-resveratrol. Además, el espectro de masas de este compuesto mostró una fragmentación patrón similar al obtenido para el isómero *trans*. El espectro de masa de barrido de ion dio señales a 5,80 y 8,13 min y mostró un patrón de fragmentación similar al observado para el *trans*-resveratrol. Para identificar estos compuestos de



manera correcta se realizó una degradación de *trans*-resveratrol a una concentración de 5 µg/mL bajo UV (254 nm) durante 3 h y luego se analizó usando el método LC-MS / MS (Careri et al., 2004).

Una mejor sensibilidad se logró mediante el funcionamiento en el modo NI, porque bajo estas condiciones el espectro de masas de ESI de *trans*-resveratrol fue dominado por el [M-H]<sup>-</sup>ion. La masa de ion producto de NI, mostró un espectro de *trans*-resveratrol con ión abundante a m/z 143 (100 % de intensidad relativa) y picos adicionales a m/z 185 (60 %), 159 (25 %) y 119 (20 %). En base a estos resultados espectrales se supervisó la transición 227→143 en modo estándar con fines de validación y ensayos cuantitativos (Careri et al., 2004).

Los resultados obtenidos de las concentraciones de *trans*-resveratrol y *cis*-resveratrol disminuyeron, respectivamente, con porcentajes de 74 % y 26 % con respecto a sus concentraciones iniciales. Esto se puede explicar al hablar de la isomerización donde probablemente el *trans*-isómero se convierte rápidamente al isómero *cis* y subsiguientemente ambos isómeros polimerizan y forman oligómeros de resveratrol. En cuanto a los resultados se puede decir que el método LC-ESI-MS / MS en condiciones NI llega a ser una valiosa herramienta para el análisis cuantitativo del resveratrol en vinos tintos. En cuanto a los resultados de la validación realizados también en el estudio de Careri et al. (2004) prueban una excelente detectabilidad, linealidad, precisión y selectividad de la LC-ESI-MS /MS, junto con su capacidad para obtener datos inequívocos (Careri et al., 2004)

#### **4.5.5 ELECTROFORESIS CAPILAR**

La electroforesis capilar (CE según sus siglas en inglés) es una técnica que se utiliza recientemente, como un método alternativo a los métodos descritos anteriormente, o la desorción laser, a continuación descrita; sin embargo, algo a recalcar de este método es la gran complejidad de los cromatogramas para el análisis de alimentos, en este caso el resveratrol en muestras de vino. En general las técnicas

basadas en la electroforesis capilar presentan un límite de detección entre 50 y 280 ppb, este límite de detección es mayor que el obtenido por otros métodos, sin embargo, la mayoría de estos métodos permiten a su vez el análisis de varios polifenoles simultáneamente (Montero, 2001).

#### **4.5.6 DESORCIÓN LASER**

Esta técnica es acoplada a la espectroscopia de ionización resonante, posteriormente se realiza la detección por espectrometría de masas por tiempo de vuelo, aplicada para los compuestos no volátiles. La desorción láser posibilita la vaporización de moléculas térmicamente lábiles sin necesidad de procesos previos de extracción o separación de muestra, esto se tomaría en cuenta como una ventaja de la técnica. La ionización multifotónica mejorada por resonancia (REMPI por sus siglas en inglés) permite la ionización altamente selectiva y eficaz de un analito en una matriz compleja. En su conjunto la LD + REMPI + TOFMS (desorción laser mejorada con ionización multifotónica resonante acoplada a espectrometría de masas con tiempo de vuelo) se perfila como una técnica universal para el análisis directo de trazas en matrices complejas. En cuanto al análisis de resveratrol se debe tomar en cuenta su carácter térmicamente lábil, que mediante la desorción láser favorece la vaporización de este compuesto frente a posibles procesos de fragmentación, lo cual, acoplado a la alta selectividad y eficacia de la ionización REMPI junto con la espectrometría de tiempo de vuelo hace de esta técnica un recurso eficaz para el análisis de trazas de *trans*-resveratrol (Montero, 2001).

#### **4.6 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RESVERATROL**

En cualquier análisis químico donde se aplique una técnica analítica existen ciertos parámetros que van a permitir determinar la eficiencia del método, así como obtener resultados de manera cuantitativa y comparables para futuros estudios.

- **Límite de linealidad**

Es el valor máximo para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito (Skoog , West y Holler, 2005)

- **Límite de detección (LOD)**

El límite de detección se define como la concentración mínima del analito en una muestra que se puede detectar con fiabilidad en un proceso analítico determinado. Este parámetro se obtiene a partir de varias medidas del blanco, calculando su valor medio y la desviación estándar según la ecuación  $LOD = \bar{x} + 3SD$ , que indica ser la media más 3 veces la desviación estándar, esto, transformándolo a concentración utilizando la recta de calibrado (Skoog et al., 2005).

- **Sensibilidad**

Es la pendiente de la curva de calibración. Da a conocer la capacidad del método para discriminar entre dos concentraciones muy próximas por lo que se sabe que, “si es mayor la pendiente, más sensible será el método (Harris, 2007).

- **Método de adiciones múltiples**

Los patrones de calibración deben aproximarse a la composición de las muestras que se analizan, no solo con respecto a la concentración del analito sino también en relación con las concentraciones de otras especies en la matriz de la muestra, con el fin de minimizar los efectos de los diversos componentes de las muestras en la medida realizada (Skoog et al., 2005). Dado que el efecto matriz es el efecto de todos los componentes de la muestra distintos al analito, a la hora de aplicar un método analítico se traduce en una diferencia de sensibilidad del mismo

Para evitar el efecto matriz se realiza el método de adiciones múltiples que consiste en añadirle a varias alícuotas de muestra una cantidad conocida de una disolución estándar de analito para obtener la denominada recta de calibrado de adiciones múltiples (Cenusa, 2016).

- **Reproducibilidad.**

La reproducibilidad o precisión se expresa como la desviación estándar (S) o el coeficiente de variación (CV). Para medir la reproducibilidad normalmente se trabaja con varias muestras de la misma manera con cada una de ellas, en algunas de las bibliografías se utilizan 4 muestras o hasta 8 muestras (Skoog et al., 2005).

En cuanto a la linealidad, y con respecto al ensayo de Bustos et al. (2012), se determinó mediante la inyección de 5 concentraciones de soluciones de resveratrol en ppm: 10, 25, 50, 75 y 100, con lo que se obtuvo resultados para la curva de calibración. Para cada concentración se realiza una repetición de cuatro medidas que posteriormente son promediadas para construir la curva de calibración y obtener el coeficiente de correlación lineal utilizando la relación señal/ruido del pico del analito de la solución de la curva de calibración de 0,5 ppm. Con las definiciones señal/ruido de 3 para LOD y 10 para LOQ (límite de cuantificación), los valores se estimaron a 0,017 ppm y 0,055 ppm, respectivamente (Bustos et al., 2012)

Una vez que se han analizado las técnicas para la determinación de resveratrol, se puede comparar todas estas y establecer una que sea más eficiente en base a condiciones de trabajo como resultados obtenidos. En cada una de las técnicas y métodos empleados para el análisis de resveratrol, se pueden analizar ciertas ventajas y desventajas. En lo que se refiere al análisis por HPLC, se puede decir que el trabajo con esta técnica es más rápido, reproducible, confiable y no necesita gran cantidad de analito en comparación con técnicas clásicas.

Enfocándonos en lo que es el equipo HPLC se puede decir que un detector de 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, además se ahorra el tiempo y material de análisis. Así también, en cuanto a interpretación de resultados en trabajo con UV o DAD es más simple ya que se basa en tiempo de retención y el cromatograma es mucho más sencillo como se observa en la Figura 8, mientras que con espectrometría de masas el cromatograma es la relación de abundancia con masa carga, como muestra la Figura 9.

En lo referente a los resultados de MS/MS se podría explicar la mejora de la selectividad sin interferencias de matriz contrastando con la detección UV, así se logra demostrar mayor precisión del método de MS/MS en el análisis de resveratrol. Además, a pesar de la alta selectividad en espectrometría tándem, los perfiles cromatográficos de LC-MS/MS de vino tinto sugieren una inyección directa con resultados óptimos.

En los múltiples casos, se debe cuidar las condiciones y los solventes a utilizar, esto lleva a una conclusión importante donde el trabajo con acetonitrilo es eficiente, igualmente con metanol, sin embargo, al trabajar con agua la recuperación de resveratrol disminuye.

En la mayoría de técnicas implementadas, también se logra la identificación del *cis*-resveratrol por lo que se debe trabajar necesariamente con estándares. En los ensayos analizados también se puede recalcar que el trabajo con resveratrol debe ser cuidadoso al momento de variar de pH

Se observó que finalmente en todas las técnicas se puede identificar y cuantificar el resveratrol, y que los resultados dependerán más bien del tipo de vino que de la técnica utilizada. Algunos resultados, como al utilizar la técnica de HPLC, los vinos tintos que presentaron más estilbenos fueron los Merlot y Cabernet Sauvignon, ya que hay mucho más tiempo de contacto con la piel de uva en la elaboración de vino tinto que con la elaboración de vino blanco, y los niveles de resveratrol se concentran en la piel de la uva, esto también se muestra en la Tabla 3. Esta misma razón se hace evidente al observar los resultados del análisis en el vino blanco por Lee y Rennaker (2007), donde el nivel de resveratrol es menor en comparación con los vinos tintos comparados por el mismo autor.

Sin embargo, como ya se ha mencionado anteriormente, la eficiencia de la implementación de un método no solo dependerá de reproducibilidad o selectividad de

análisis sino de facilidad de trabajo, ya sea por preparación de muestra así como tiempos de análisis. De acuerdo a esto y a lo analizado en la Tabla 3, la cromatografía líquida de alta resolución con detector DAD podría ser la mejor opción de trabajo, donde la preparación de la muestra es simple, ocupando una extracción en fase sólida, la utilización de solventes como acetonitrilo o metanol, también aporta positivamente al análisis, ya que por solubilidad del analito mejora las condiciones. Así también se puede decir que el tiempo de análisis no es tan extenso, encontrándose en un rango de 3 – 5 min. En comparación con un detector de masas puede ser que no se tengan límites de detección más bajos, lo que brindaría sensibilidad a la técnica, algo que también se observa en la Tabla 3, sin embargo según la bibliografía, en la determinación de resveratrol en vino tinto no se necesitarían niveles tan bajos (Young et al., 2016).

## 5. CONCLUSIONES

- Los vinos tintos, de acuerdo a su proceso de vinificación poseen mayor concentración de resveratrol que vino rosa o blanco. La concentración de resveratrol en vinos tintos oscila entre 0,001 y 10 mg/L, en vinos rosados entre 0,05 y 1,2 mg/L y en blancos desde trazas hasta 0,019 mg/L
- Se pueden utilizar tres técnicas principales para la determinación de resveratrol en vino tinto, donde HPLC-UVvis o HPLC-DAD son las más comunes. Las técnicas de GC-MS y LC-MS también son técnicas que se pueden utilizar, sin embargo, al contrastar condiciones como tiempo de análisis, límites de detección, sensibilidad y técnicas de extracción previas al análisis, HPLC-UVvis es la técnica óptima para la determinación de resveratrol, ya que posee límites de detección bajos, el tiempo de análisis no sobrepasa los 15 min, como ocurre con HPLC con detector de fluorescencia. Así mismo, la preparación de la muestra es rápida y más accesible realizando una filtración simple y se puede manejar una inyección directa, lo que no ocurre con el trabajo con detector de masas, donde se debe realizar una derivatización a la muestra. Al trabajar con detectores de masas, se obtienen menores tiempos de análisis, sin embargo, la preparación de muestra debe ser apropiada, y por lo general el uso de este detector implica una mayor inversión, al ser más sensible es más costosos, mientras que HPLC es más accesible.
- HPLC con detector de fluorescencia no es una técnica recomendada porque a pesar de poseer buenos límites de detección, el tiempo de análisis es más largo que al realizar con detector de masas.
- En espectrometría de masas la transición de iones monitorizada fue  $m/z$  227  $\rightarrow$  184,7. De las técnicas APCI-MS/MS y ESI-MS mostraron que el modo APCI es más sensible que el modo ESI.

## 6. RECOMENDACIONES

- ✓ Al elegir un método de trabajo se debe analizar el presupuesto, ya que las técnicas acopladas con espectrometría de masas suelen ser más costosas.
- ✓ Se requiere un estudio *in vivo* para evaluar cualquier efecto fisiológico del resveratrol en vinos, de esta forma se conocerá en profundidad el comportamiento del resveratrol así como de los demás fenoles que poseen los vinos que de igual manera son beneficioso. Con el estudio *in vivo* se podrá concluir de manera estadística lo que confiere al consumo de vino tinto como antioxidante.



## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adrian, M., Rajaei, H., Jeandet, P., Vaneau J. y Bessis, R. (1998). Resveratrol Oxidation in Botrytis cinerea Conidia. *Phytopathology.*, 88(5), 472-476. doi:10.1094/PHYTO.1998.88.5.472
- Alonso, J. (2013). *Directo al Paladar*. Recuperado de <https://www.directopaladar.com/enologia/el-increible-proceso-quimico-que-transforma-el-mosto-en-vino>
- Bernard, L. y Kussmann, M. (2010). *Mass Spectrometry and Nutrition Research*. Suiza: Royal Society of Chemistry.
- Bustos, S., Calisaya, J., Paredes, C., Duran, G., Taquichiri, M., Alvarado, J. y Peñarrieta M. (2012). Cuantificación de Resveratrol en vino mediante HPLC. *Revista Boliviana de Química*, 29(2), 164-169
- Careri, M., Corradini, C., Elviri, L., Nicoletti, I. y Zagnoni I. (2004). Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry of *cis*-Resveratrol and *trans*-Resveratrol, Development, Validation, and Application of the method to red wine, grape and winemaking byproducts. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23), 6868-6874. doi:doi/abs/10.1021/jf049219
- Cenusa, A. (2016). *Determinación de polifenoles en vinos mediante un sensor de nanoparticulas de Cerio* (Master en Enología). Universitat Politecnica de Valencia. Valencia.
- Collado, Q. (2001). Levaduras y fermentación alcohólica II. Recuperado de <https://www.verema.com/blog/verema/500449-levaduras-fermentacion-alcoholica-ii>
- Ertan, R., Vural, N. y Kizilet, E. (2012). An alternative method for the determination of some of the antioxidant phenolics in varietal turkish red wines. *Journal of the Institute of Brewing*, 114(3), 239-245, doi: 10.1002/j.2050-0416.2008.tb00334.x/pdf
- Fernandez, L. (2017). Tipos de vinos tintos y sus maridajes. Recuperado de <https://saborgourmet.com/tipos-de-vinos-tintos/>
- Gambini, J., López, R., Olaso, G., Inglés, M., Abdelazid, K., El Alami, M., Bonet-Costa, Borrás, C. y Viña, J. (2013). Resveratrol: distribución, propiedades y

perspectivas. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*, 48(2), 79-88.  
doi:10.1016/j.regg.2012.04.007

González, C., Ramirez, P., Santos, S. y Gálvez, M. (2013). *La química en la vida cotidiana*. Madrid : UNED.

Harris, D. (2007). *Análisis químico cuantitativo*. Barcelona: Reverte.

Hernández, J. (2005). Cromatografía líquida de alta eficiencia . *Hospital Univeritari Germans Trias*. SEQC, (8) 49-62

Lamas, J. (2012). *Vix*. Recuperado de <http://www.vix.com/es/imj/gourmet/2783/tipos-de-vino-blanco>

Lee, J. y Rennaker, C. (2007). Antioxidant capacity and stilbene contents of wines produced in the Snake River Valley of Idaho. *Food Chemistry*, 105(1), 195-203.  
doi:doi:10.1016/j.foodchem.2007.03.069

Lucas, C. (2009). *Estudio de la complejación del resveratrol por diferentes tipos de ciclodextrinas* (Tesis de doctorado). Universidad Católica San Antonio. Murcia.

Mark, L., Nikfardjam, M., Avar, P., y Ohmacht, R. (2005). A validated HPLC method for Quantitative analysis of *trans*-resveratrol and *trans*-piceid in Hungarian wines. *Journal of Chromatographic Science*, 43(9). 445-449

Masis, A., Vega M., Sánchez, J. (2013). El Resveratrol y sus posibles usos como nueva terapia farmacologica. *Revista medica de Costa Rica y Centroamerica*, 70(608), 679 - 684

Marques, I. (2014). *Uva, Fruta milenaria llena de propiedades saludables*. Recuperado de <http://www.fundaciondelcorazon.com/corazon-facil/blog-impulso-vital/2646-uva-fruta-milenaria-llena-de-propiedades-saludables.html>

Montero, C. (2001). *Desarrollo de técnicas de espectroscopía laser y su aplicación al análisis químico de alimentos* (Tesis de doctorado). Universidad Complutense de Madrid. Madrid.

Pindado, O., Pérez, R., Gracia, S., Barrad,o A., Sevillano, M. y González, D. (2006). *Desarrollo de Metodologías para la Determinación de Componentes Orgánicos del Aerosol Atmosférico*. Madrid: Informes Técnicos Ciemat. Recuperado de

[http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/\\_Public/38/030/38030361.pdf](http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/38/030/38030361.pdf)

Polo, C. y Moreno-Arribas, V. (2008). *Wine Chemistry and Biochemistry*. España: Springer Science.

Prez, L. y De Rincon, S. (2000). *El vino arte que se puede beber/ the Wine is drinkable Art*. México: Panarama Editorial S.A.

Rodríguez, M., González, G., García, F. y Pérez, J. (2001). Contenido en trans-resveratrol de los vinos tintos de Tenerife. *Jornadas Técnicas VitiVícolas Canarias*. Recuperado de <http://www.tenerife.es/Casa-vino/jornadas/pdf/PDF%20JORNADAS%20III/087-096%20Contenido%20en%20trans%20revelator.pdf>

Romero-Perez, A., Lamuela-Reventos, M., WaterHouse, A. y de la Torre-Boronat, C. (1996). Levels of *cis*- and *trans*-Resveratrol and Their Glucosides in White and Rose vinifera wines from Spain. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8), 2124-2128. doi:doi/abs/10.1021/jf9507654

Romero-Peréz, A., Ibern-Gómez, M., Lamuela-Raventos, M. y de la Torre-Boronat C. (1999). Piceid, the major Resveratrol derivative in grape juices. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4) 1533-1536.

Ruiz, J. (2003). *Física y Química*. España: MAD, S.L.

Salazar, R., Espinoza, G., Ruiz, C. y Rojas, M. (2011). Compuestos fenólicos, actividad antioxidante, contenido de resveratrol y componentes del aroma de 8 vinos peruanos. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 77(2), 57-63.

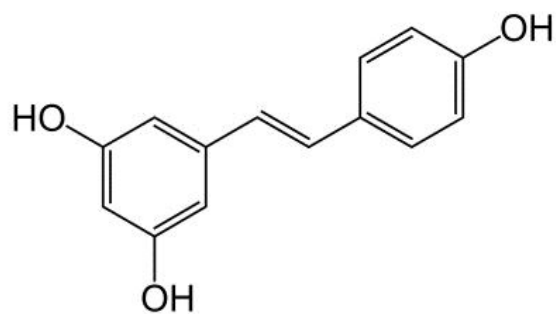
Señorio de Nevada (2015). *Tipos de vino*. Recuperado de [http://www.senoriode nevada.es/templates/cadenas/smart/images/fotos\\_hotels/HSNEVADA/varios/Tipos\\_de\\_uva.pdf](http://www.senoriode nevada.es/templates/cadenas/smart/images/fotos_hotels/HSNEVADA/varios/Tipos_de_uva.pdf)

Sierra, I., Perez, D., Gómez, S. y Morante, S. (2010). *Análisis Instrumental*. España: Netbiblo S. L.723

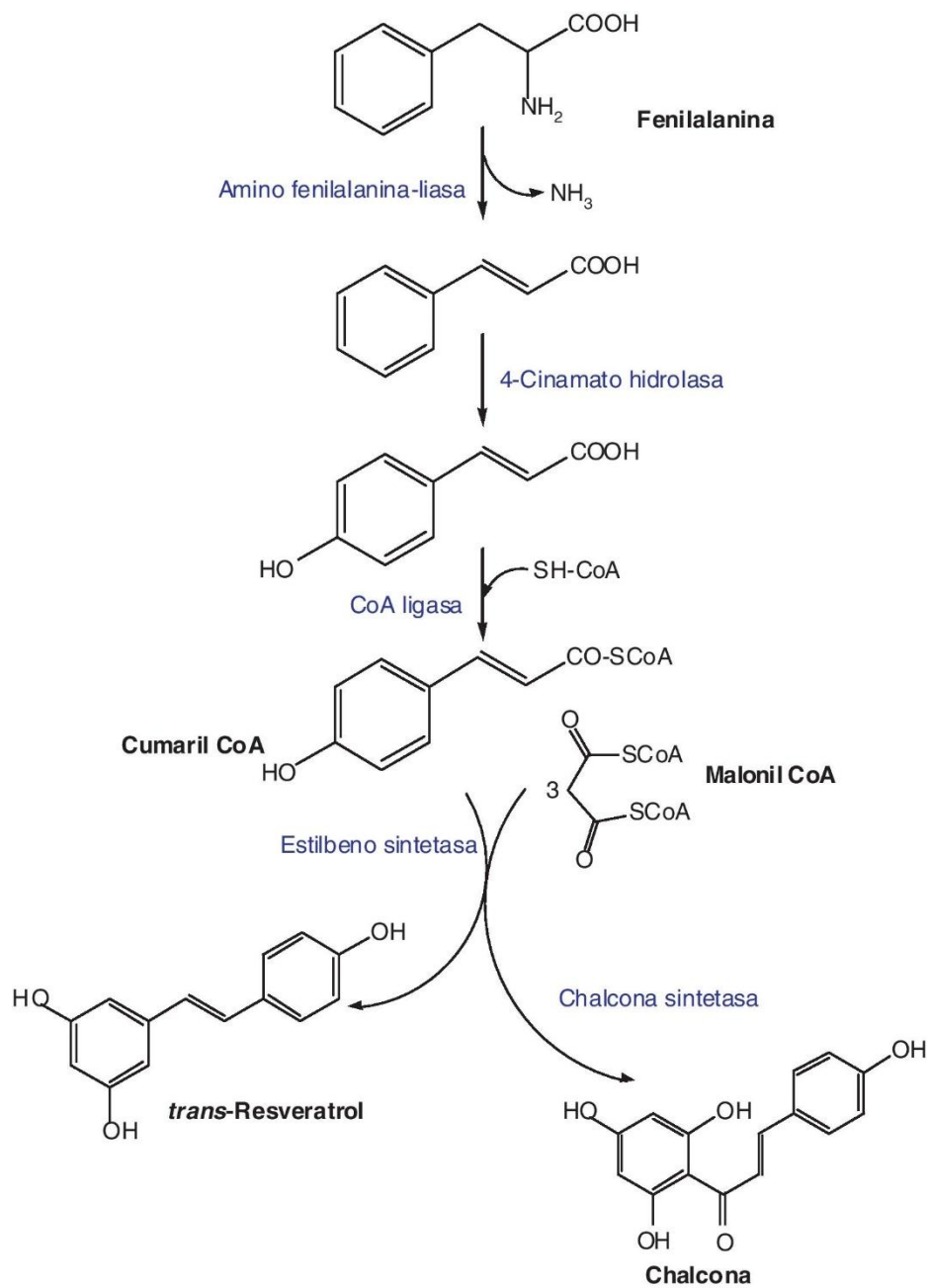
Skoog, D., West D. y Holler, J. (2005). *Fundamentos de Química Analítica*. Barcelona: Reverte.

- Stenerson, K. (2017). The analysis of resveratrol in red wine by on-fiber derivatization/SPME. *Sigma-Aldrich*, 27. Recuperado de <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/reporter-us/the-analysis-of-resveratrol.html>
- Trela, B. y Waterhouse A. (1996). Resveratrol: Isomeric Molar Absorptivities and Stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(5), 1253-1257. doi:DOI: 10.1021/jf9504576
- UNAM. (2007). Técnicas Cromatográficas. REA. *DASD*, 11. *Universidad Nacional Autónoma de México* Recuperado de [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos\\_6700.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf)
- Valls J., Lampreave, M., Nadal, M. y Arola, L. (2000). Importancia de los compuestos fenólicos en la calidad de los vinos tintos de crianza. *Alimentación, equipos y tecnología* 19 (2) 119-124.
- Villajizan, J. (2000). *El vino salud y placer*. Mexico: LIBSA.
- Vlase, L., Kiss, B., Leucuta, S. y Gocan, S. (2009). A rapid method for determination of resveratrol in wines by HPLC-MS. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 32(14) 2105-2121. doi:DOI: 10.1080/10826070903126989
- Young, J., Lim M., Topete, J., Hang, H., Gahol, M., Pesek, J. y Matyska, M. (2016). Improved Sensitivity and Specificity for Trans-Resveratrol in red wine analysis with HPLC-UV and LC-MS. *LCGC North America*, 34(3), 206-213. Recuperado de <http://www.chromatographyonline.com/improved-sensitivity-and-specificity-trans-resveratrol-red-wine-analysis-hplc-uv-and-lc-ms>

## 8. FIGURAS



**Figura 1. Estructura química del resveratrol. La fórmula molecular es  $C_{14}H_{12}O_3$**   
(Bustos et al., 2012)



**Figura 2. Biosíntesis del *trans*-resveratrol** (Gambini et al., 2013)

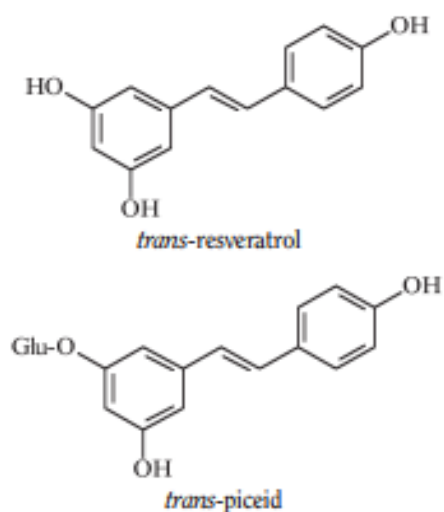


Figura 3. Estructura química del *trans-resveratrol* y del *trans-piceida* glucósido (Mark et al., 2005)

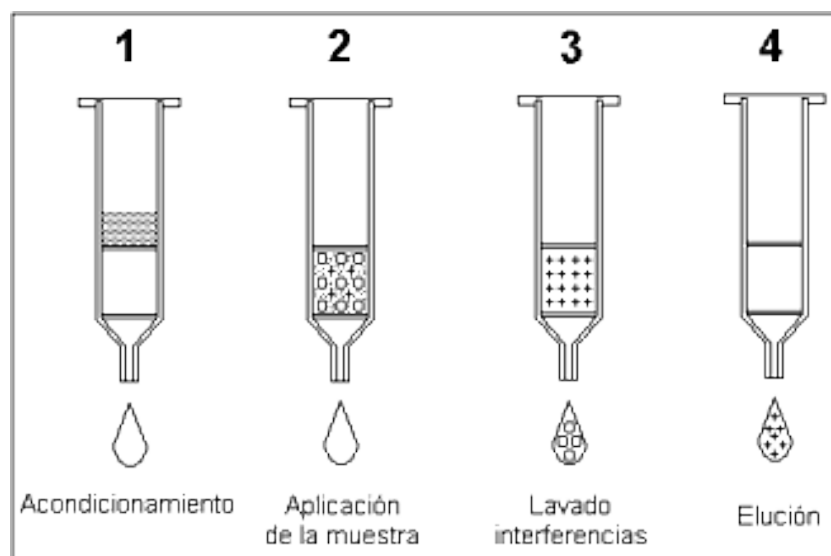


Figura 4. Micro extracción con sorbente empaquetado acondicionamiento, aplicación de muestra, lavado de interferencias y elución (Young et al., 2016).

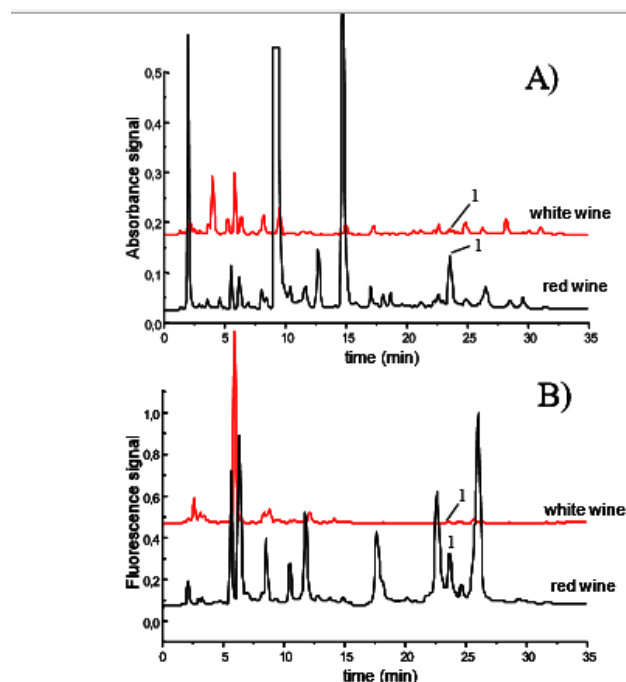


Figura 5. Cromatogramas del vino blanco y vino tinto utilizando detector de absorbancia y de fluorescencia a) señal de absorbancia, b) señal de fluorescencia (Rodríguez et al., 2001)

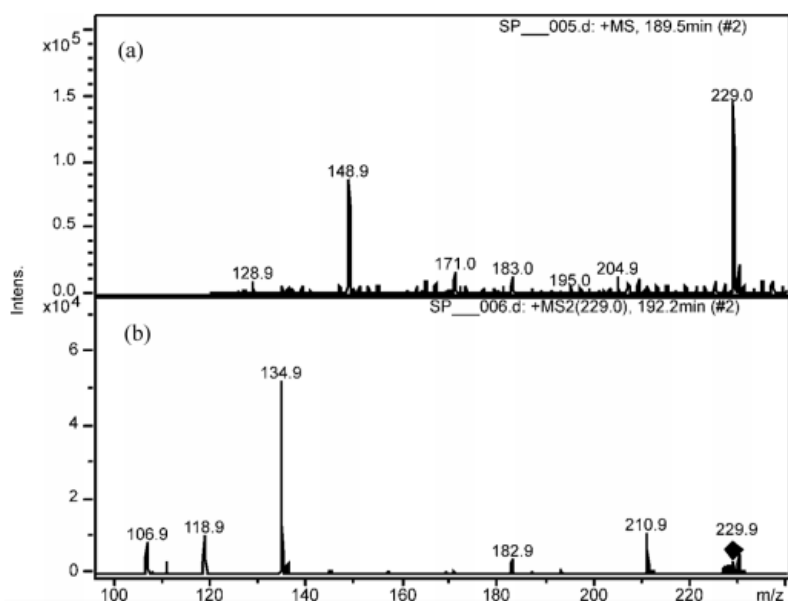
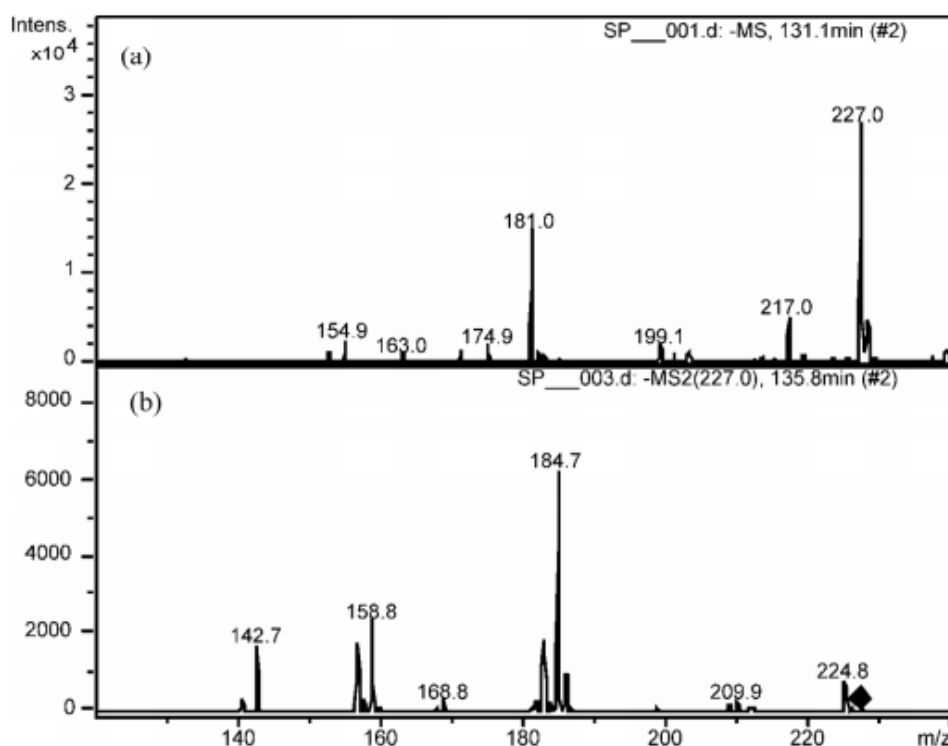
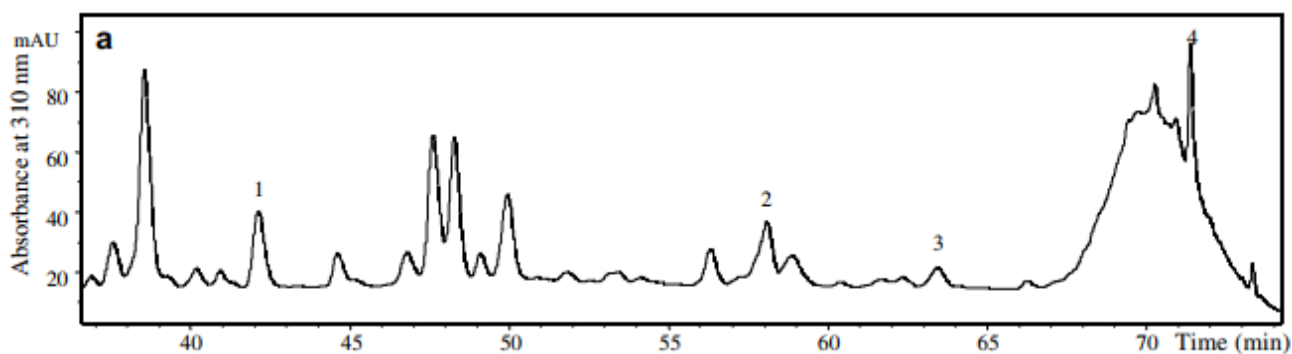


Figura 6. Espectro del *trans*-resveratrol y del pseudo ion molecular con  $m/z=229$  con ionización positiva. a) *trans*-resveratrol b) pseudo ion molecular (Vlase et al., 2009)





**Figura 7. Espectro del *trans*-resveratrol y del pseudo ion molecular con  $m/z=227$  en modo de ionización negativa a) *trans*-resveratrol b) pseudo ion molecular (Vlase et al., 2009)**



**Figura 8. Espectro de resveratrol en HPLC detector UV pico 1 resveratrol, (Lee y Rennaker, 2007) : 1: *trans*-piceida, 2: *cis*-piceida, 3: *trans*-resveratrol and 4: *cis*-resveratrol**

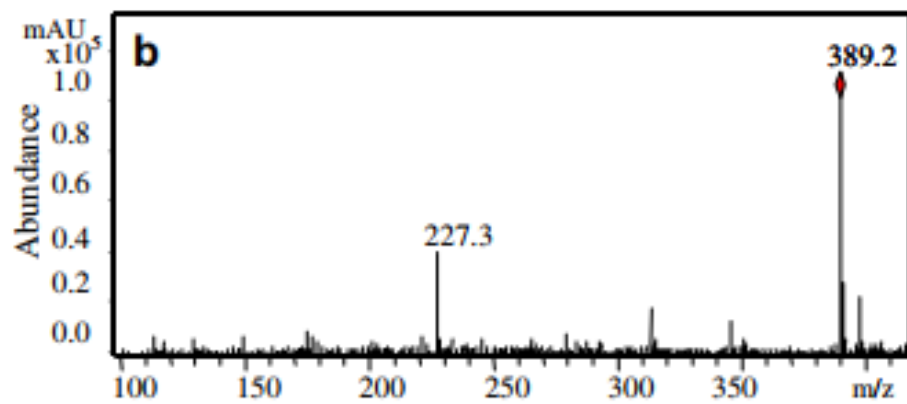


Figura 9. Espectro de resveratrol en HPLC masas (Lee y Rennaker, 2007)

## 9. TABLAS

Tabla 1. Desventajas de las diferentes técnicas de extracción utilizadas para la determinación de resveratrol (Montero, 2001).

TÉCNICAS	DESVENTAJAS
Extracción en fase sólida	Disminución de las intensidades y áreas de los picos cromatográficos
Extracción con solventes orgánicos	Pérdida de analito
Evaporación por rotavapor	Provoca inestabilidad del <i>trans</i> -resveratrol

Tabla 2. Límites de detección del *cis* y *trans* resveratrol y tiempo de análisis de acuerdo a cada técnica aplicada

TÉCNICA DE ANÁLISIS		LÍMITES DE DETECCIÓN		TIEMPO DE ANÁLISIS		REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
	Longitud de onda	<i>trans</i> -resveratrol	<i>cis</i> -resveratrol	<i>trans</i> -resveratrol	<i>cis</i> -resveratrol	
HPLC-UVvis	306 nm	1,2 µmol /L	0,9 µmol/L	7,3 min	8 min	(Trela y Waterhouse, 1996).
	286 nm	0,6 µmol /L	0,6 µmol/L			
HPLC DEDECTOR DE FLUORESCENCIA	-lamda de excitación de 360 nm -lamda de emisión de 374 nm	0,003 mg/L	-	24 min	-	(Rodríguez et al, 2001).
LC-MS	-	0,3 µmol	-	2,45 min	-	(Mark et al., 2005).
LC-MS/MS	-	0,9 µmol	-	5,80 min	17,96 min	(Careri et al.2004)

**Tabla 3. Concentraciones de *trans*-resveratrol de acuerdo a cada técnica referida**

TECNICA	TIPO DE VINO	<i>Trans</i> -resveratrol	<i>cis</i> -resveratrol	<i>cis</i> pieced	<i>trans</i> pieced	REFERENCIA
HPLC -UV	varios vinos tintos de Tenerife	2,90 mg/L	-	-	-	(Rodríguez et al., 2001)
HPLC -Fluorescencia	varios vinos tintos de Tenerife	2,95 mg/L	-	-	-	(Rodríguez et al., 2001)
HPLC- DAD	Vinos de la región de Bolivia	7,7 mg/L	-	-	-	(Bustos et al., 2012)
(HPLC/DAD/ESIMS/MS)	Cabernet Sauvignon	1.45 mg/L	n.a	2.35 mg/L	1.65 mg/L	(Lee y Rennaker, 2007)
	Chardonnay	0	n.a	0.26 mg/L	0.14 mg/L	
	Merlot	1.58 mg/L	n.a	2.76 mg/L	3.15 mg/L	
LC-MS	Vino tinto	0,32 mg/L	-	-	-	(Young et al., 2016)

**Tabla 4. Efecto del solvente en el porcentaje de recuperación de resveratrol por 10 ppm de solvente utilizando la microextracción con sorbentes empaquetados. (Young et al., 2016)**

Solvente	Recuperación (%)
100 % metanol	99.8
15 % agua desionizada – 85 % acetoneitrilo	94.6
50 % desionizada – 50 % acetoneitrilo	94.6
85 % agua desionizada – 15 % acetoneitrilo	55.0
100 % agua desionizada	3.6