

# Optimización y validación de un método por HPLC en fase reversa en columna monolítica para el análisis de *trans* resveratrol en vino

## Optimization and validation of a RP-HPLC method to determine *trans* resveratrol in wine using a monolithic column

FANNY C PADILLA\*, YOLAIZA RIVERA, IRENE VERGARA, MARIELA RINCÓN, LIZET BOU RACHED

### RESUMEN

El consumo moderado y regular de vino protege contra el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y cáncer. Estos beneficios están asociados a compuestos antioxidantes presentes en el vino como el resveratrol. El presente trabajo tiene como objetivo la optimización y validación de un método analítico por HPLC para la cuantificación del *trans* resveratrol presente en los vinos tintos de producción nacional. Para la optimización del método se evaluaron dos tipos de solventes orgánicos, sistemas de gradiente y volumen de inyección. Las condiciones cromatográficas con las que se obtuvo la mejor separación de los antioxidantes fueron columna monolítica C18 a 30°C, sistema de gradiente acetonitrilo: agua acidificada con ácido fosfórico a pH 3, detector UV a una longitud de onda de 306 nm, volumen de inyección de 30 µL. El proceso de validación demostró que el método cumple con los criterios de validación establecidos: Especificidad, linealidad ( $r > 0,99$ ), repetibilidad  $<$  al 2%, precisión intermedia  $<$  al 2,7%, exactitud (97-102%), límite de detección 0,0557 ppm, límite de cuantificación 0,1857 ppm, siendo el método robusto. El método se aplicó en la cuantificación del *trans* resveratrol en muestras de vino tinto de producción nacional (Syrah, Petit Verdot y Tempranillo) obteniéndose 2,45 y 0,92 ppm de resveratrol para el Syrah y Petit Verdot, respectivamente, mientras el Tempranillo presentó un contenido de 0,16 ppm inferior al límite de cuantificación.

**Palabras clave:** Resveratrol, vino tinto, HPLC, columna monolítica.

### Abstract

Moderate and regular consumption of wine may protect against cardiovascular diseases and cancer. These benefits are associated to antioxidant compounds present in wine like *trans* resveratrol. The main objective of this work was optimization and validation of an HPLC method to quantify *trans* resveratrol present in red wines of national production. Optimization was performed by evaluation of two types of organic solvents in the mobile phase, different gradient programs, and injection volumes. Best chromatographic conditions for the separation of antioxidants were: a C18 monolithic column at 30°C, a gradient program with acetonitrile: water, acidified with phosphoric acid to pH 3, UV detector at 306 nm, and an injection volume of 30 µL. The method validation process demonstrated that it complied with all the established acceptance criteria: Specificity, the method was able to separate resveratrol from any interference of other compounds present. Linearity with a regression coefficient  $> 0.99$ , repeatability and intermediate precision with a coefficient of variation  $\leq 2\%$  and  $2.7\%$  respectively, accuracy in the range of 97-102%, limit of detection of 0.0557 ppm and limit of quantification of 0.1857 ppm. The method was robust. Application of this method for quantification of *trans* resveratrol in red wine samples of national production (Syrah, Petit Verdot and Tempranillo) presented 2.45 and 0.92 ppm of *trans* resveratrol for the first two samples, and a *trans* resveratrol content of 0.16 ppm for Tempranillo, amount smaller than the limit of quantification.

**Key words:** Resveratrol, red wine, HPLC, monolithic column

Postgrado de Aseguramiento de la Calidad, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

\* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia

E-mail: fannypadilla@hotmail.com

## Introducción

Estudios recientes indican que ciertas enfermedades cardiovasculares, el envejecimiento prematuro de la piel y enfermedades como el cáncer están asociadas al estrés oxidativo. La oxidación es un proceso químico que tiene lugar continuamente en el organismo por lo que compuestos antioxidantes ingeridos en la dieta diaria, son fundamentales para la prevención de estas enfermedades (Sánchez-Valle y Méndez-Sánchez, 2013).

Los compuestos fenólicos son el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal. En los últimos años se ha demostrado que una dieta rica en polifenoles vegetales puede mejorar la salud y disminuir la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Schroeter y col., 2006; Perez-Vizcaino y col., 2009). La capacidad de los polifenoles para modular la actividad de diferentes enzimas, y para interferir consecuentemente en mecanismos de señalización y en distintos procesos celulares, puede deberse, al menos en parte, a las características fisicoquímicas de estos compuestos, que les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción. Sus propiedades antioxidantes justifican muchos de sus efectos beneficiosos.

En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Estos compuestos se denominan polifenoles. Se originan principalmente en las plantas, que los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario. Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales. Otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.).

Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides. La biosíntesis de los polifenoles como producto del metabolismo secundario de las plantas tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido siquímico y la ruta de los poliacetatos (Bravo, 1998). La ruta del ácido siquímico proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina), y la síntesis de los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano).

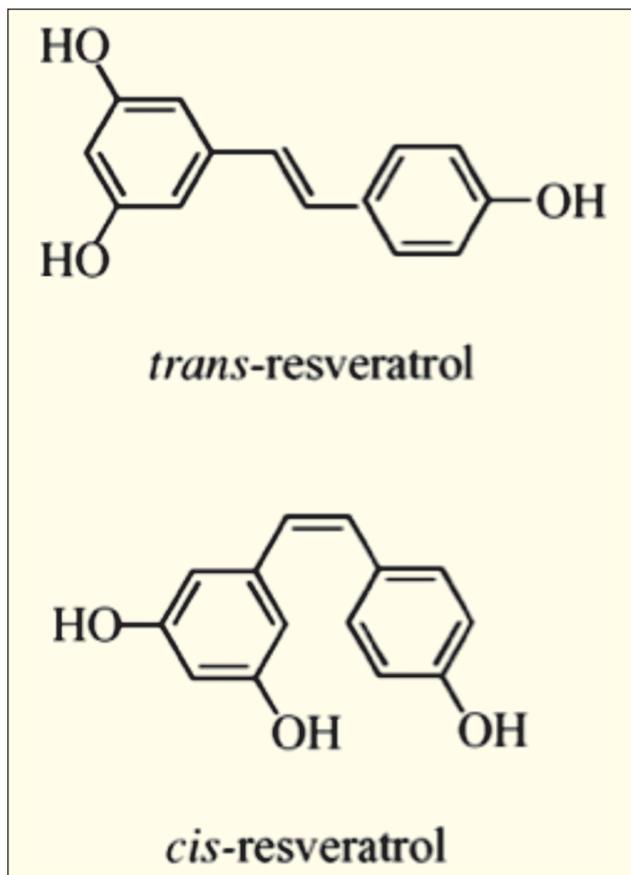
Debido al contenido y tipo de compuestos fenólicos y a la actividad antioxidante del vino, se ha sugerido que su consumo podría tener un potencial terapéutico, ya que se ha demostrado que su consumo regular y moderado, tiene un efecto protector contra el desarrollo de importantes patologías como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (Leighton y col., 1998; Faustino y col., 2003; Guéndez y col., 2005; Monagas y Gómez-Cordoves, 2005; Careri y col., 2003).

Entre los compuestos fenólicos más importantes presentes en el vino se encuentran los siguientes grupos: ácidos benzoicos, ácidos cinámicos (como el ácido *p*-cumárico y el ácido ferúlico), derivados de la tirosina, estilbenos y flavonoides como por ejemplo, la catequina, epicatequina y quercetina (Flanzy, 2003).

Uno de los polifenoles presentes en el vino, que por su alto poder antioxidante despierta en la actualidad mayor interés es el resveratrol. Este interés ha progresado en los últimos años, debido a los estudios epidemiológicos realizados, que indican una relación inversa entre el consumo moderado de vino y el riesgo a las enfermedades coronarias, considerando que el resveratrol es el compuesto mayormente responsable de la actividad anticancerígena tanto *in vivo* como *in vitro* (Goldfinger, 2003; Acquaviva y col., 2002; Vidavalur y col., 2006).

El resveratrol es una fitoalexina llamada 3',5,4'-trihidroxiestilbeno que existe de manera natural en dos formas, *cis* y *trans*, las cuales se encuentran en equilibrio y tienen actividades biológicas similares (Figura 1) (Jeandet y col., 1991; Takashi y col., 2009). Este polifenol es el estilbeno más abundante de las uvas, y además se encuentra presente en una variedad de plantas como *Veratrum grandiflorum*, *Polygonum cuspidatum*. El resveratrol es producido en las plantas durante períodos de estrés ambiental como en infecciones fúngicas, daño, o irradiación con luz ultravioleta. A pesar de que el sustrato, 4-coumaroil-CoA, malonil-CoA está presente en todas las plantas, la mayoría de ellas no contienen la enzima (resveratrol sintetasa) necesaria para la biosíntesis del resveratrol (Labinskyy y col., 2006).

Las uvas, materia prima en la fabricación del vino, tienen un contenido variable de compuestos fenólicos en la piel, pulpa y semillas. El vino tinto es una excelente fuente de polifenoles y puede contener entre 1000-4000 ppm de flavonoides que tienen diferentes actividades biológicas (Arnous y col., 2001). El resveratrol se encuentra de manera abundante especialmente en la piel de la uva roja, por lo que se encuentra presente en el vino tinto y en menor cantidad en el vino blanco. En la piel de las uvas,



**Figura 1.** Estructura del *trans* y *cis* resveratrol (Abert Vian y col., 2005)

el resveratrol alcanza concentraciones entre 50 a 100 µg/g de peso fresco, asimismo el vino blanco, rosado y tinto contiene *trans* - resveratrol. En el vino tinto, las concentraciones de este compuesto se encuentran entre 0,1 a 14 mg/L con uno de los niveles más altos reportados en vinos de la cepa de uvas Pinot noir (Otto y col., 1999; Stewart y col., 2003; Labinsky y col., 2006; Opie y col., 2007; Netzel y col., 2003). La presencia de altas concentraciones de resveratrol se asocia al proceso de elaboración en los que la maceración y fermentación de las uvas se produce en contacto con la piel y es en ésta donde se encuentran la mayoría de los polifenoles. El contenido y composición final de polifenoles no solo depende del tipo de uvas y los procesos antes mencionados; también dependen del método de producción así como de las reacciones químicas que tienen lugar durante el envejecimiento (Czyzowska y Pogorzelski, 2004).

Diferentes estudios epidemiológicos han sugerido que la dieta Mediterránea está asociada con un riesgo reducido de enfermedades cardiovasculares (Keys y col., 1986, De Lorgeril y col., 1999), de hecho se ha relacionado la ingesta moderada de vino tinto rico en resveratrol con disminución del riesgo de enfermedad coronaria, reducción de daño al miocardio

durante isquemia – reperfusión, inhibición de la oxidación de las LDL y supresión de la agregación plaquetaria y adhesión de leucocito. Asimismo, algunos investigadores han indicado que el efecto cardioprotector del resveratrol es debido a su capacidad antioxidante (Wu y col., 2001). Adicionalmente, se ha comprobado que su posible actividad como fitoestrógeno puede contribuir a su acción cardioprotectora (García y Caraballo, 2001; Kinsella y col., 1993; Careri y col., 2003). Igualmente se ha demostrado que el resveratrol, puede disminuir los depósitos del péptido β-amiloide en el cerebro por lo que se ha sugerido un papel neuroprotector en la enfermedad de Alzheimer (Marambaud, 2005).

El método más frecuente para la cuantificación e identificación del resveratrol es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Varios autores han realizado estudios para el desarrollo y optimización de métodos analíticos empleando columnas C18, con detectores UV, de fluorescencia y con arreglo de diodos (Malovana y col., 2000; Rodríguez-Delgado y col., 2001; Kolouchova y col., 2004, Ozan y col., 2007).

Recientemente, se han empleado las columnas en fase reversa Chromolith, que son barras monolíticas de sílica, libre de metal, altamente porosas, condición que permite la aplicación de altos flujos a muy bajas presiones, aumentando la productividad analítica, logrando una mayor adsorción de los analitos y por ende la separación cromatográfica está garantizada en términos de eficiencia y resolución (Merck, 2005). El uso de estas columnas ha permitido el análisis de los compuestos fenólicos en el vino por inyección directa de la muestra, cuantificación en una simple corrida y corto tiempo (Abert Vian y col., 2005; Massimo y col., 2002).

En Venezuela, hasta el presente no se ha descrito y aplicado un método para cuantificar resveratrol en vinos tintos; por ello nos propusimos optimizar y validar un método analítico por HPLC en fase reversa para la cuantificación del *trans*-resveratrol presente en algunos vinos tintos de producción nacional, utilizando una columna Chromolith y detector UV.

## Materiales y métodos

### MUESTRAS

Las muestras de vinos tintos comerciales de diferentes varietales de uvas de producción nacional, fueron obtenidas en el mercado nacional. Tempranillo (composición varietal: 95% Tempranillo, 5% Petit Verdot y grado alcohólico: 12,6° GL), Petit Verdot (composición varietal: 98% Petit Verdot, 2% Tempranillo y grado alcohólico: 12,8° GL) y Syrah (composición varietal: 98% Syrah, 2% Petit Verdot y grado

alcohólico: 12,8° GL). Es importante tomar en cuenta que el varietal Syrah se conoce también como Shiraz y la denominación depende del sitio de origen: Syrah de Francia y Shiraz de Australia (Rogiers y col. 2004).

La fermentación, maduración y añejamiento es similar para los tres tipos de vino. La fermentación y maduración se realiza en tanques de acero inoxidable a temperatura entre 25-27 °C, durante ocho días y el añejamiento consiste en mantener el vino durante 5 a 18 meses en barricas de roble americano o roble francés (Gonzales, 2013).

Las muestras fueron filtradas a través de membrana de 0,45 µm e inyectadas directamente en el cromatógrafo.

#### REACTIVOS

El ácido *p*-coumárico, dihidrato de quercetina, *trans*-resveratrol 99% GC (Sigma) y ácido ferúlico 99% (Aldrich) se usaron como patrones. Todos los solventes orgánicos y el agua utilizados en la preparación de las soluciones fueron grado HPLC, los demás grado analítico.

#### SOLUCIONES PATRÓN

Las soluciones patrón se prepararon para obtener 186,1; 160,4; 211,5 y 288,4 ppm, de ácido *p*-coumárico, quercetina, *trans*-resveratrol, y ácido ferúlico, en una mezcla de etanol y agua (75:25 v/v).

#### SOLUCIÓN DE TRABAJO

Diariamente se preparó la solución de trabajo como la mezcla de las soluciones patrón, tomando una alícuota de la solución patrón de cada antioxidante para obtener concentraciones: de ácido ferúlico, *p*-coumárico, *trans* resveratrol, y quercetina de 2,88; 1,86; 2,11 y 8,00 ppm, respectivamente; utilizando la misma mezcla de etanol-agua para la dilución.

#### CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Para el desarrollo, validación y aplicación del método se utilizó un equipo cromatográfico (HPLC) Waters (Milford, MA, USA), con un inyector automático (717 plus Autosampler), sistema de bombas (1525 binary HPLC pumps), detector UV (2487 Dual λ Absorbance Detector), Integral Vacuum Degasser/Plunger, acoplado a una computadora con el programa BREEZE (Waters) para el procesamiento de datos. Se utilizó una columna Chromolith Performance RP-18e 100-4.6 mm (Merck) y una precolumna RP-18e 5-4.6 mm.

Las condiciones cromatográficas iniciales fueron las empleadas por Massimo y col. (2002), con gradiente de elución binario *Fase A*: metanol:agua (2,5:97,5 v/v), *Fase B*: metanol:agua (50:50 v/v), ambas fases acidificadas con ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) a pH 3, flujo de 2,1 mL/min, temperatura de 30° C, a 306 nm y un volumen de inyección de 20 mL.

Para optimizar el método y sus resultados se realizaron pruebas cambiando en las dos fases la proporción de metanol o sustituyendo el metanol por acetonitrilo, que cambia la fuerza del solvente y su selectividad. Posteriormente se cambió el volumen de inyección para evaluar luego en los cromatogramas obtenidos la adecuación del sistema.

#### VALIDACIÓN

Para la validación se consideraron los siguientes parámetros: especificidad, precisión, linealidad, exactitud, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ) y robustez cumpliendo previamente con los requisitos de adecuación del sistema.

#### ESPECIFICIDAD O SELECTIVIDAD

Para determinar la selectividad, se usó la solución de la muestra de vino tinto (Syrah) al 100% y la mezcla de patrones con *cis* resveratrol al 100%. Se considera el 100% una concentración de 2 ppm del *trans* resveratrol, pues diferentes investigadores reportan que la concentración promedio del *trans* resveratrol en el vino tinto es de aproximadamente 2 ppm (Massimo y col., 2002; Nikfardjam y col., 2005; Stervbo y col., 2007).

La mezcla de patrones con *cis* resveratrol se preparó tomando una alícuota (100 µl) de las soluciones de ácido ferúlico, *p*-coumárico, solución de *cis* resveratrol obtenido a partir de la solución madre de *trans* resveratrol expuesta a la luz natural durante 5 h y 500 µl de la solución de quercetina; llevando a volumen con la mezcla de etanol: agua (75:25) en balón de 10 mL. Se realizó una inyección de cada una de las soluciones anteriores, de la fase móvil y del solvente.

Se considera que el procedimiento analítico cumple con este parámetro si es capaz de separar el analito de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes; y si además, los productos de degradación y/o sustancias relacionadas y otros componentes no interfieren con la cuantificación del analito.

#### LINEALIDAD

Se realizaron mediciones por duplicado de cinco (5) soluciones estándar de *trans* resveratrol al 60%,

80%, 100%, 120% y 140%; considerando el 100% de *trans* resveratrol la concentración de 2 ppm. La regresión lineal se calculó a partir del promedio de las áreas obtenidas para cada concentración evaluada, obteniéndose la ecuación de la curva y el coeficiente de correlación. El criterio de aceptación para este parámetro viene dado por la obtención de un coeficiente de correlación  $\geq 0,990$  (AOAC, 2002).

#### ADECUACIÓN DEL SISTEMA

Se determinó la precisión del sistema realizando cinco (5) inyecciones consecutivas de la mezcla de estándares al 100% de la concentración de trabajo, considerando como criterio de aceptación un coeficiente de variación  $\leq 2\%$ . Asimismo, se realizó la adecuación del sistema calculando los siguientes parámetros cromatográficos: número de platos teóricos (N), factor de capacidad (k) y asimetría del pico o factor de cola (T) utilizando el programa Breeze de Waters.

#### PRECISIÓN

La precisión del método fue realizada a nivel de precisión intra-diaria (repetibilidad) y precisión interdiaria (precisión intermedia o reproducibilidad). Para determinar la repetibilidad del método se realizaron seis (6) inyecciones directas de la muestra de vino tinto Syrah (100%) previamente filtrada por membrana de  $0,45 \mu\text{m}$ , expresando los resultados en % de la desviación estándar relativa (%DER) o coeficiente de variación (CV). Este valor debe ser  $\leq 2\%$

Dos analistas y en días diferentes determinaron la precisión intermedia con seis inyecciones de la muestra de vino tinto al 100%. El valor del %DER de los resultados obtenidos por el analista 1 y 2, deberá ser  $\leq 8\%$  (AOAC, 2002).

#### EXACTITUD

Se utilizó el método con estándar añadido para el análisis de las muestras. Se realizó sobre tres (3) soluciones de la muestra por triplicado más el blanco (muestra sin estándar añadido) a las concentraciones aproximadas de 80%, 100% y 120% del analito.

Para preparar las soluciones se tomó la alícuota de la solución patrón de *trans* resveratrol correspondiente a cada nivel de concentración antes mencionado, se añadió 5 mL de la muestra de vino tinto Syrah y se llevó a 10 mL con solvente (etanol: agua 75:25).

Se determinó el porcentaje de recuperación, cuyo criterio de aceptación para concentraciones del analito cercanos a 1 ppm debe ser de 75 a 120% (AOAC, 2002).

#### LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD) Y CUANTIFICACIÓN (LOQ)

Para determinar el LOD definido como la mínima concentración del analito que puede detectarse pero no cuantificarse y LOQ correspondiente a la mínima cantidad del analito que puede cuantificarse con adecuada precisión, se utilizaron las siguientes ecuaciones  $\text{LOD} = 3,3 \text{ DE} / b$  y  $\text{LOQ} = 10 \text{ DE} / b$  (Miller y Miller, 1993).

Donde: DE = desviación estándar de la respuesta y b = pendiente de la curva de calibración.

#### ROBUSTEZ

Para determinar la robustez del método analítico se evaluaron los resultados obtenidos en la precisión intermedia.

### Resultados y discusión

#### OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO

Para optimizar los resultados obtenidos se realizaron pruebas cambiando la proporción de metanol, variando así la fuerza del solvente. Asimismo, se sustituyó el metanol por acetonitrilo, ya que por sus propiedades químicas, tiene una selectividad diferente a la del metanol, una mayor fuerza de solvente y constituye la primera alternativa cuando se busca cambiar la fuerza del solvente. Asimismo, se realizaron cambios en el flujo, volumen de inyección y gradiente.

La combinación de fases móviles con las cuales se obtuvo la mejor separación de los compuestos tanto en la solución de los patrones como en muestra fue la siguiente:

*Fase A:* acetonitrilo:agua (2:98 v/v), *Fase B:* acetonitrilo:agua (40:60 v/v), ambas acidificadas con ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) a pH 3.

Posteriormente se probaron dos sistemas de gradientes seleccionándose como el más adecuado aquel que produjo mejor resolución y menor tiempo de corrida, lo cual se obtuvo con el uso del sistema de gradiente (Tabla I), que logró disminuir el tiempo de corrida a 18 minutos (Figura 2) obteniendo una resolución aceptable de 3,858 por lo que se tomó este gradiente como definitivo ya que proporcionó un método más rápido y con buena resolución.

Asimismo, se modificó el volumen de inyección y se evaluaron en los cromatogramas obtenidos, la línea base, números de platos teóricos, resolución, tiempo de corrida, definición e integración de los picos.

Después de evaluar los resultados obtenidos las condiciones cromatográficas finales fueron: Columna: monolítica Cromolith, temperatura:  $30^\circ\text{C}$ , tiempo de corrida: 18 min, longitud de onda: 306 nm,

volumen de inyección: 30 ml, *Fase A*: acetonitrilo; agua (2:98 v/v) acidificada con  $H_3PO_4$  a pH 3, *Fase B*: acetonitrilo: agua (40:60 v/v) acidificada con  $H_3PO_4$  a pH 3, sistema de gradiente (Tabla I).

**Tabla I**  
**Sistema de gradiente**

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	A (%)*	B (%)**
0	3.0	95	5
1,5	3.0	80	20
3	3.0	60	40
4	1.0	60	40
8,5	1.0	40	60
12,5	1.2	65	35
16,5	1.5	95	5
17	3.0	95	5
18	3.0	95	5

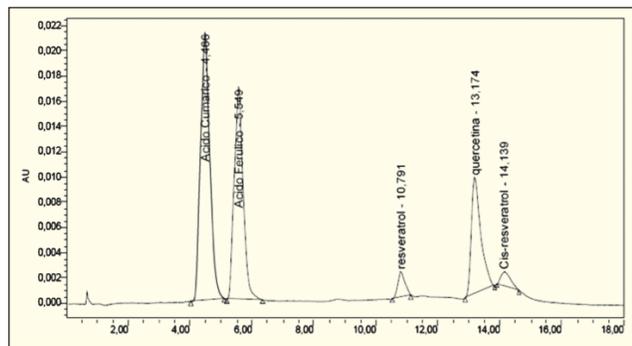
\*A = acetonitrilo:agua (2:98 v/v) acidificada con ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) a pH 3

\*\*B = acetonitrilo:agua (40:60 v/v) acidificada con ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) a pH 3

## Validación

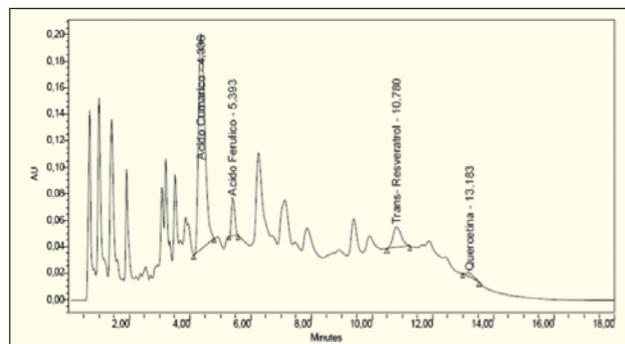
### ESPECIFICIDAD / SELECTIVIDAD

De acuerdo a los cromatogramas obtenidos (Figura 2 y 3), los tiempos de retención para los picos de *trans* resveratrol (patrón), ácido ferúlico, ácido *p*-coumárico, quercetina y del *cis* resveratrol se presentan en la Tabla II.



**Figura 2. Cromatograma de patrones de antioxidantes, fase móvil A: acetonitrilo:agua (2:98 v/v) acidificada con ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) a pH 3. B: acetonitrilo:agua (40:60 v/v) acidificada con ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) a pH 3.**

Durante la corrida de las inyecciones tanto de la fase móvil como la del solvente, no se evidenció ningún pico cromatográfico que pudiera interferir con la cuantificación del *trans* resveratrol. Estos resultados indican que el método es específico por ser capaz de separar el *trans* resveratrol sin que exista interferencia de otros compuestos presentes, como el *cis* res-



**Figura 3. Selectividad del método cromatográfico. Cromatograma de la muestra de vino tinto Syrah.**

**Tabla II**

**Tiempos de retención de los patrones de antioxidantes y la muestra de vino tinto (Syrah)**

Compuesto	Tiempo de retención	Tiempo de retención
	Patrón degradado	Muestra (min) (min)
Ácido <i>p</i> -coumárico	4,466	4,336
Ácido ferúlico	5,549	5,393
<i>Trans</i> resveratrol	10,791	10,780
Quercetina	13,174	13,183
<i>Cis</i> resveratrol	14,139	---

veratrol producto de degradación del isómero *trans* y otros antioxidantes como los ácidos ferúlico, y *p*-coumárico y la quercetina, y otros picos no identificados.

### ADECUACIÓN DEL SISTEMA

Del cromatograma obtenido (Figura 2) se calcularon los parámetros cromatográficos que determinan la adecuación del sistema.

El valor obtenido del factor de capacidad ( $k'$ ) se consideró aceptable ya que este puede variar de 1 a 20 y el resultado obtenido de 9,77 cumplió con este parámetro.

El grado de simetría se expresa como T (factor de cola). Su medición es importante puesto que puede llevar de acuerdo a su magnitud a errores considerables de cuantificación. En un pico simétrico T es la unidad y se incrementa a medida que la cola se hace más pronunciada; los valores ideales están entre 0,9 y 1,1; el valor encontrado 1,31 es aceptable ya que pueden integrarse sin mayores dificultades picos que presentan un factor de asimetría de 2 (Quatrocchi y col., 1992). Asimismo, el alto número de platos teóricos (7095,161) y el %DER (1,28%) (Tabla III) refuerzan la adecuación del sistema.

**Tabla III**  
**Precisión del sistema en solución patrón de resveratrol (2,0 ppm)**

Réplica	Áreas	
1	269438	
2	263962	
3	264227	
4	271672	
5	265584	
	Promedio	266977
	Desv. Estd	3416,60
	% DER	1,28

#### LINEALIDAD

Los resultados obtenidos (Tabla IV y Fig. 4) demuestran que la relación de las áreas de los picos contra concentración real de las soluciones estándar en un rango de 60-140% es lineal obteniéndose un coeficiente de correlación de 0,994; que cumple con el parámetro de linealidad ya que el valor de  $r$  debe ser mayor a 0,990 (AOAC, 2002; Quatrocchi y col., 1992).

**Tabla IV**  
**Estudio de la linealidad del método (100% = 2,0 ppm)**

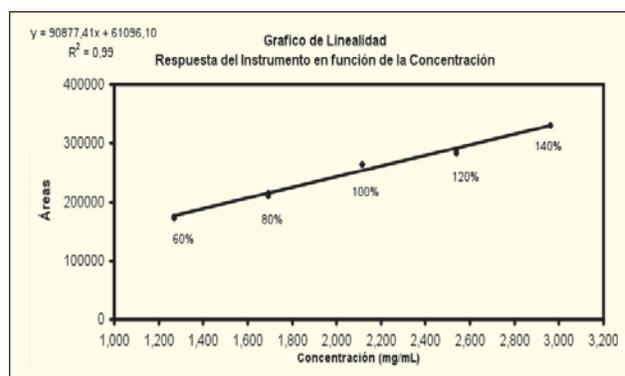
Patrón	Conc (ppm)	Área
60%	1,269	172728
	1,269	175780
80%	1,692	214836
	1,692	210441
100%	2,115	264227
	2,115	263962
120%	2,538	283183
	2,538	287266
140%	2,960	330062
	2,960	330206
	Pendiente	90877,41
	Intercepto	61096,1000
	$r$	0,994

#### PRECISIÓN

##### REPETIBILIDAD (PRECISIÓN INTRA DIARIA)

La Tabla V presenta los resultados de las áreas obtenidas por el analista 1 para las seis inyecciones de la muestra de Syrah. Se encontró un %DER de las seis (6) determinaciones de 1,495; demostrando

que el método cumple con el parámetro de repetibilidad ya que presenta un %DER o CV  $\leq 2,0$ .



**Figura 4.** Curva de calibración de resveratrol (área vs ppm).

**Tabla V**  
**Precisión del método intradiaria (repetibilidad)**

Analista 1		
Muestra	Área	Contenido (ppm)
1	318853	2,526
2	305248	2,418
3	312376	2,474
4	310394	2,459
5	314579	2,492
6	309375	2,450
	Promedio	2,470
	Desv. Estd	0,036
	% DER	1,495

#### PRECISIÓN INTERMEDIA (PRECISIÓN INTER DIARIA)

En la Tabla VI se presentan los resultados obtenidos por cada uno de los analistas para las seis inyecciones de la muestra de Syrah. La desviación estándar relativa (% DER) obtenida por cada analista fue menor a 2% y en conjunto fue de 2,547% demostrando que el método cumple con el parámetro a nivel de precisión intra e inter diaria.

#### EXACTITUD

Los resultados del porcentaje de recuperación para cada concentración se muestran en la Tabla VII. El valor mínimo de porcentaje de recuperación obtenido fue de 97% y el máximo de 102%, por lo que se considera que el método cumple con el parámetro de exactitud ya que los valores de porcentaje del analito recuperado para las diferentes concentraciones se encuentran dentro del criterio establecido de 75-120% (AOAC, 2002).

**Tabla VI**  
**Precisión inter diaria (reproducibilidad)**

Analista 1			Analista 2		
Muestra	Área (ppm)	Contenido	Muestra	Área	Contenido (ppm)
1	318853	2,526	1	304973	2,342
2	305248	2,418	2	305281	2,345
3	312376	2,474	3	307425	2,361
4	310394	2,459	4	310133	2,382
5	314579	2,492	5	308012	2,366
6	309375	2,450	6	312076	2,397
	Promedio	2,470		Promedio	2,365
	Desv. Estd	0,036		Desv. Estd	0,021
	% DER	1,495		% DER	0,896
	Analista 1 y 2				
	Promedio	2,418 ppm			
	Desv. Estd	0,061			
	% DER	2,547 %			

**Tabla VII**  
**Exactitud del método en la determinación de resveratrol**

Muestra	Área	Área Mx-Blanco	Fact Dil Est Añad *	Conc Est Añad (ppm) **	Recuperación (%)
Blanco	222693	-	-	-	-
80%	307181	84488			102
	303172	80479	1666,67	0,634	97
	305755	83062			101
100%	359726	137033			100
	358936	136243	1000,00	1,057	99
	359757	137064			100
120%	411296	188603			98
	410142	187449	714,29	1,480	97
	414757	192064			100
			Promedio		99

\*Fact Dil Est Añad = Factor de dilución de estándar añadido

\*\*Conc Est Añad. = Concentración del estándar añadido

#### LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Para el LOD y LOQ se encontraron los siguientes valores 0,0557 y 0,1857 respectivamente, aplicando la ecuación de Miller y Miller (1993).

#### ROBUSTEZ

Los resultados de precisión intermedia (Tabla VI) demuestran que el método al ser aplicado bajo condiciones operacionales diferentes (dos analistas y días diferentes) se obtienen valores reproducibles, por lo que se puede decir que el método cumple con este parámetro.

#### APLICACIÓN DEL MÉTODO A DIFERENTES TIPOS DE VINOS NACIONALES

En la Tabla VIII se muestran las concentraciones de *trans* resveratrol obtenidas para cada tipo de vino. El contenido de *trans* resveratrol muestra gran variabilidad entre los diferentes tipos de vino ya que depende de numerosos factores como: variedad de uva, clima y terreno, una cosecha temprana o tardía, las diferentes técnicas de vinificación, el tiempo de fermentación del jugo de la uva en presencia de la piel y las semillas, entre otros (Leighton y col., 1998; Czyzowska y Pogorzelski, 2004; Netzel y col., 2003).

**Tabla VIII**  
**Contenido promedio de *trans* resveratrol en muestras de vinos nacionales (N=3)**

Tipo de Vino	Concentración (ppm)
Petit Verdot	0,9170 ± 0,0135
Tempranillo	0,1595 ± 0,0631
Syrah	2,4510 ± 0,0275

En la muestra de vino Tempranillo se pudo detectar el pico correspondiente al *trans* resveratrol tomando en cuenta el tiempo de retención, obteniendo un valor de 0,1595 ppm el cual es inferior a los resultados entre 1,01-2,33 ppm obtenidos por Abril y col., (2005) para los vinos tintos Tempranillo de diferente denominación de origen en Aragón (España). Asimismo, este valor está por debajo del límite de cuantificación (0,1857 ppm), lo cual no garantiza el cumplimiento con los parámetros de precisión y exactitud.

En los resultados de la Tabla VIII se observa que el vino Syrah presenta la concentración más alta de *trans* resveratrol en los vinos estudiados, la cual es similar a la obtenida por Malovana y col. (2000) en vinos tintos de las Islas Canarias (2,22-3,25 ppm), más alta que la reportada por Nikfardjam y col. (2006) para los vinos tintos Syrah de Hungría (1,1 ppm) y dos vinos Syrah de Tailandia (Woraratphoka y col. (2007). Este nivel de concentración más alto puede ser atribuido a que el vino analizado no es obtenido de un solo varietal de uvas sino de una mezcla, siendo el varietal Syrah el de mayor proporción. Asimismo, pueden influenciar las diferencias en el proceso de obtención y otras mencionadas anteriormente.

El vino Petit Verdot presentó un contenido de resveratrol más alto que los resultados obtenidos

por Dugo y col. (2006) y La Torre y col. (2006) en los vinos sicilianos.

## Conclusiones

Se logró desarrollar y optimizar un método analítico por HPLC en fase reversa para la separación de compuestos fenólicos y la cuantificación del *trans* resveratrol que cumple con todos los criterios de aceptación para los parámetros evaluados, permite la inyección directa de las muestras sin necesidad de un tratamiento previo y obtención de resultados en un tiempo de corrida corto. Este método ofrece ventajas con respecto a otras metodologías analíticas que utilizan 2 columnas monolíticas en serie, pues se utiliza una sola columna monolítica para lograr la separación de antioxidantes y se reduce el tiempo de corrida aproximadamente en un 50%. Por último los niveles de *trans* resveratrol del vino tinto Syrah producido en Venezuela son similares a los producidos en otros países.

## Referencias bibliográficas

- Abert Vian M, Tomao V, Gallet S, Coulomb PO, Lacombe JM. 2005. Simple and rapid method for cis-and trans-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using Chromolith columns. *J Chromatogr A* 1085: 224-229.
- Abril M, Negueruela A, Pérez C, Estopañan J T. 2005. Preliminary study of resveratrol content in Aragón red and rosé wines. *Food Chem* 92:729-736.
- Acquaviva R, Russo A, Campisi A, Sorrenti V, Giacomo CD, Barcellona ML, Avitabile MA, Vanella A. 2002. Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of resveratrol. *J Food Sci* 67:137-141.
- AOAC. Guidelines for Single Laboratory. Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals; 2002, p. 18-22.
- Arnous A, Makris DP, Kefalas P. 2001. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *J Agric Food Chem* 49:5736-5742.
- Bravo L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56: 317-333.
- Careri M, Corradini C, Elviri L, Nicoletti I, Zagnoni I. 2003. Direct HPLC analysis of quercetin and trans resveratrol in red wine, grape, and wine making byproducts. *J Agric Food Chem* 51(18): 5226-5231.
- Cyzowska A, Pogorzelski E. 2004. Changes to polyphenols in the process of production of must and wines from black currants and cherries. Part II. Anthocyanins and flavanols. *European Food Res Tech* 218: 355-359.
- De Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Marmelle N. 1999. Mediterranean diet, traditional risk factors and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 99: 779-785.
- Dugo G, Dugo P, Vilasi F, Magnisi R, Mondello L, La Torre GL. 2006. Determination of the polyphenolic content in sicilian wines of protected geographical indication. *Ital J Food Sci* 18: 409-422.
- Flanzy C. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. 2ª ed. Madrid, España: Mundi-Prensa Libros; 2003, p. 219.
- Faustino RS, Sobrattee S, Edel AL, Pierce GN. 2003. Comparative analysis of the phenolic content of selected Chilean, Canadian and American merlot red wines. *Mol Cel Biochem* 249:11-19.
- García M, Caraballo C. 2001. Efecto del consumo del vino tinto sobre la concentración de lípidos en el plasma y la susceptibilidad de oxidación de las lipoproteínas de alta y baja densidad. (Tesis doctoral). Caracas: Escuela de Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela.
- Goldfinger TM. 2003. Beyond the French Paradox; the impact of moderate beverage alcohol and wine consumption in the prevention of cardiovascular disease. *Cardiology Clinics* 21:449-457.
- Gonzales LA. 2013. Trabajo de pasantías realizado en Cervecería Polar Planta Pomar Decanato de Ciencias y Tecnología Ingeniería de Producción Universidad Centroccidental «Lisandro Alvarado».
- Guéndez R, Kallithraka S, Makris DP, Kefalas P. 2005. Determination of low molecular weight polyphenols constituents in grape (*Vitis vinifera* sp) seed extracts correlation with antiradical activity. *Food Chem* 89:1-9.
- Jeandet P, Bessis R, Gautheron B. 1991. The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *Am J Enol Vitic* 42: 41-46.
- Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, Dontas AS, Fidanza F, Keys MH. 1986. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol* 124: 903-915.
- Kinsella JE, Frankel E, German B, Kanner J. 1993. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Tech* 47:85-89.
- Kolouchova I, Melzoch K, Filip V, Smidrkal J. 2004. Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detections in wines. *Food Chem* 87: 151-158.
- La Torre GL, Saitta M, Vilasi F, Pellicano T, Giacomo Dugo G. 2006. Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection. *Food Chem* 94: 640-658.
- Labinsky N, Csiszar A, Veress G, Stef G, Pacher P, Oroszi G, Wu J, Ungvari Z. 2006. Vascular dysfunction in aging: Potential effects of resveratrol, an anti-inflammatory phytoestrogen. *Curr Med Chem* 13 (9): 989-996.
- Leighton F, Urquiaga I, Casanegra P. 2007. Polifenoles en el vino: la clave de su capacidad antioxidante *Boletín Ciencia Vino y Salud (Seriada en línea)*. 1998. May; 2(2):(1 página). Disponible en: URL: <http://www.bio.puc.cl/vinsalud/indexbol.htm#3>
- Malovana S, García FJ, Pérez JP, Rodríguez MA. 2000. Optimization of sample preparation for the determination of trans-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta* 428:245-253.

- Monagas M, Bartolomé B, Gómez-Cordovés C. 2005. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Crit. Reviews Food Sci Nutr* 45:85-118.
- Marambaud P. 2005. Resveratrol Promotes Clearance of Alzheimer's Disease Amyloid- $\beta$  Peptides. *J Biol Chem* 280: 373-380.
- Massimo C, Sartini E, Fabiani A, Arfelli G, Amati A. 2002. Analysis of wine phenolics by High-Performance Liquid Chromatography using a monolithic type column. *J Chromatogr* 973: 221-227.
- Merck. Determinación de vitaminas hidro y liposolubles en multivitamínicos por HPLC con CHROMOLITH PERFORMANCE Rp18e. Merck News División Química (Seriada en línea). 2005. Jun;2(1):4-5. Disponible en: URL: [http://www.merck.com.pe/mpsa/site/wmsp.nsf/vstAdmDocDow/News\\_Junio/\\$File/News-Jun2005.pdf](http://www.merck.com.pe/mpsa/site/wmsp.nsf/vstAdmDocDow/News_Junio/$File/News-Jun2005.pdf). Consultado Mayo 15, 2007.
- Miller JC, Miller JN. Estadísticas para química Analítica. 2ª ed. Delaware, USA: Addison-Wesley Iberoamericana; 1993.
- Netzel M, Strass G, Bitsch I, Konitz R, Christmann M, Bitsch R. 2003. Effect of grape processing on select antioxidant phenolics in red wine. *J Food Eng* 56:223-228.
- Nikfardjam M, Márk L, Avar P, Figler M, Ohmacht R. 2006. Polyphenols, anthocyanins, and trans-resveratrol in red wines from the Hungarian Villány region. *Anal Chim Acta* 98: 453-462.
- Opie L, Lecour S. 2007. The red wine hypothesis: from concepts to protective signaling molecules. *Eur Heart J* 28: 1683-1693.
- Otto D, Matthias S, Josef S, Peter F. 1999. Selected phenolic compounds in cultivated plants: Ecologic functions, health implications, and modulation by pesticides. *Environ Health Perspect* 107 (1): 109-114.
- Ozan G, Duygu G, Fatih D, Murat G, Sami A, Ismet S, Levent B, Mehmet U. 2007. Determination of flavans-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection. *Food Chem* 100: 518-525.
- Pérez-Vizcaino F, Duarte J, Jiménez R, Santos-Buelga C, Osuna A. 2009. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacol Rep* 61: 67-75.
- Quatrocchi O, Andrizzi S de, Laba R. 1992. Introducción a la HPLC: Aplicación y práctica. Buenos Aires: Farro S.A p. 301-328.
- Rodríguez-Delgado MA, González G, Pérez JP, García-Montelongo FJ. 2001. Trans-resveratrol in wines from the Canary Islands (Spain). Analysis by high performance liquid chromatography. *Food Chem* 76: 371-375.
- Rogiers SY, Hatfield JM, Keller M. 2004. Irrigation, nitrogen, and rootstock effects on volume loss of berries from potted Shiraz vines. *Vitis* 43: 1-6.
- Sánchez-Valle V, Méndez-Sánchez N. 2013. Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Rev Invest Med Sur Mex* 20(3):161-166.
- Schroeter H, Heiss C, Balzer J, Kleinbongard P, Keen CL, Hollenberg NK, Sies H, Kwik-Urbe C, Schmitz HH, Kelm M. 2006. (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 1024-1029.
- Stervbo U, Vang O, Bonnesen C. 2007. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chem* 101: 449-457.
- Stewart J, Artime M, O Brian C. 2003. Resveratrol: A candidate substance for prostate cancer prevention. *J Nutr* 133: 2440S-2443S.
- Takashi I, Hidefumi M. 2009. Short – step synthesis of a Resveratrol derivative from commercially available 1,3-dimethoxybenzene and 4-vinylanisole. *Biosci Biotechnol Biochem* 73 (11): 2547-2548.
- Vidavalur R, Otani H, Singal PK, Maulik N. 2006. Significance of wine and resveratrol in cardiovascular disease: French paradox revisited. *Exp Clin Cardiol* 11: 217-225.
- Woraratphoka J, Kanok-Orn I, Korakod I. 2007. Phenolic compounds and antioxidative properties of selected wines from northeast of Thailand. *Food Chem* doi: 10.1016/j.foodchem.2007.02.020.
- Wu J, Wang ZR, Hsieh TC, Bruder JL, Zou JG, Huang YZ. 2001. Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine. *Int J Mol Med* 8: 3-17.