



*Área de Nutrición y Bromatología
Departamento de Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal
Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla*

*Compuestos fenólicos del vino con capacidad
antioxidante. Puesta a punto de métodos analíticos
para estudios previos de biodisponibilidad*

Memoria presentada por
María del Valle Martínez Ortega
para optar al Grado de
Doctor en Farmacia

Sevilla, octubre de 2001

19044720

María del Valle Martínez Ortega

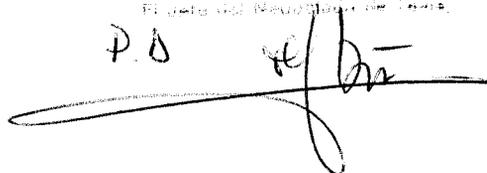
UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 133 número 249 del libro
correspondiente.

Sevilla, 26 de Octubre de 2001

El Jefe del Departamento de Tesis

P.D

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'P.D.' followed by a stylized name, possibly 'P. D. [illegible]', with a long horizontal stroke underneath.

D. ALBERTO MACHADO DE LA QUINTANA, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD, Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BROMATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL DE LA FACULTAD DE FARMACÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada "*Compuestos fenólicos del vino con capacidad antioxidante. Puesta a punto de métodos analíticos para estudios previos de biodisponibilidad*", propuesta por la Licenciada de Grado en Farmacia María del Valle Martínez Ortega para optar al Grado de Doctor en Farmacia, ha sido realizada en el Área de conocimiento de Nutrición y Bromatología de este Departamento, bajo la dirección de las Dras. Ana M^a Troncoso González, Catedrática de Universidad, y M^a Carmen García Parrilla, Profesora Asociada, durante el tiempo exigido y reuniendo los requisitos exigidos para este tipo de trabajos.

La citada Tesis ha sido realizada dentro del programa de doctorado Tecnología de Alimentos.

Sevilla, a 22 de octubre de 2001.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. Machado', with a long horizontal line extending to the right.

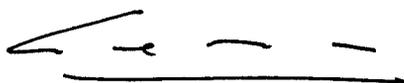
Fdo. Alberto Machado De La Quintana

Dña. ANA MARÍA TRONCOSO GONZÁLEZ, CATEDRÁTICA DE UNIVERSIDAD Y Dña. M^a DEL CARMEN GARCÍA PARRILLA, PROFESORA ASOCIADA DEL ÁREA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA, DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BROMATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, Titulada "*Compuestos fenólicos del vino con capacidad antioxidante. Puesta a punto de métodos analíticos para estudios previos de biodisponibilidad*" presentada por la Licenciada de Grado en Farmacia María del Valle Martínez Ortega para optar al Grado de Doctor en Farmacia, ha sido realizada en el Área de conocimiento de Nutrición y Bromatología, bajo nuestra dirección, reuniendo a nuestro juicio los requisitos exigidos para este tipo de trabajos, autorizándose su presentación.

Sevilla, 22 de octubre de 2001.



Fdo. Ana María Troncoso González



Fdo. M^a del Carmen García Parrilla

A mis padres
A mis hermanas
A Julio

1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	7
2. 1. CONSUMO DE VINO Y SALUD	7
2. 1. 1. Estudios Epidemiológicos	8
2. 1. 2. Situación en España	12
2. 2. LA OXIDACIÓN Y LAS SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES	14
2. 3. LOS COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN LA UVA Y EN EL VINO. CLASIFICACIÓN GENERAL Y ESTRUCTURAS QUÍMICAS	16
2. 4. EFECTOS BENEFICIOSOS DEL CONSUMO DE VINO SOBRE EL ORGANISMO	22
2. 4. 1. Efecto del Alcohol	22
2. 4. 2. Propiedades de los Compuestos Fenólicos del Vino	25
2. 5. PRESENCIA DEL RESVERATROL EN LA UVA Y EN EL VINO	36
2. 5. 1. Botrytis y Síntesis de Resveratrol en la Uva	40
2. 5. 2. Influencia del Clima sobre el Contenido de Resveratrol en el Vino	40
2. 5. 3. Influencia de los Tratamientos Enológicos sobre el Contenido de Resveratrol en el Vino	41
2. 6. BIODISPONIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DEL VINO	44
2. 6. 1. El Proceso LADME de los Compuestos Fenólicos	45
2. 6. 2. Determinación de Compuestos Fenólicos en Plasma	56

2. 6. 3. Determinación de Compuestos Fenólicos en Orina.....	59
3. OBJETIVOS.....	65
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	69
4. 1. MUESTRAS.....	69
4. 1. 1. Muestras de Vinos y Mostos.....	69
4. 1. 2. Muestras Biológicas.....	79
4. 2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES PATRÓN.....	80
4. 2. 1. Reactivos.....	80
4. 4. 2. Disoluciones Patrón de Compuestos Fenólicos.....	82
4. 3. MATERIAL E INSTRUMENTACIÓN.....	87
4. 3. 1. Cromatógrafo Líquido de Alta Eficacia.....	87
4. 3. 2. Aparato Disolutor.....	87
4. 3. 3. Espectrofluorímetro.....	87
4. 3. 4. Material de Laboratorio Diverso.....	88
4. 4. MÉTODOS.....	89
4. 4. 1. Método Cromatográfico.....	89
4. 4. 2. Ensayos de Digestión Gástrica e Intestinal.....	102
4. 4. 3. Desproteínización de Muestras de Plasma.....	102
4. 4. 4. Inhibición de la Actividad Enzimática.....	103
4. 4. 4. Estudio de Recuperación de los Fenoles en Plasma.....	103

4. 4. 5. Estudio de Recuperación de los Fenoles en Plasma.....	103
4. 4. 5. Extracción en Fase Sólida.....	103
4. 4. 6. Extracción Líquido-Líquido en Plasma.....	103
4. 4. 8. Desproteínización más Inhibición de Enzimas Plasmáticas.....	105
4. 4. 9. Estudio de recuperación de fenoles en orina.....	105
4. 4. 10. Extracción líquido-líquido en muestras de orina.....	105
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	107
5. 1. DETERMINACIÓN DE RESVERATROL Y COMPUESTOS RELACIONADOS EN VINOS Y MOSTOS.....	109
5. 1. 1. Estudio de Filtración.....	109
5. 1. 2. Niveles de Resveratrol en Mostos de Jerez de Diferentes Prensadas.....	111
5. 1. 3. Niveles de Resveratrol en Sobretablas y Vinos Generosos.....	113
5. 1. 4. Niveles de Resveratrol en Mostos de Uva.....	114
5. 1. 5. Niveles de Resveratrol en Otros Vinos de Andalucía.....	115
5. 2. ENSAYO DE DIGESTIÓN APLICADO AL VINO: CAMBIOS EN SU COMPOSICIÓN FENÓLICA.....	119
5. 2. 1. Evolución de una Disolución de Patrones Sometida a Digestión Gástrica e Intestinal.....	122
5. 2. 2. Ensayos de Digestión Gástrica e Intestinal Aplicados a Distintos Tipos de Vinos.....	123

5. 3. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	129
5. 3. 1. Establecimiento de las Condiciones para la Medida por Fluorescencia de los Compuestos Fenólicos del Vino.....	129
5. 3. 2. Validación del Método mediante CLAE con Detector de Fotodiodos y de Fluorescencia Acoplados en Serie Para Muestras Biológicas.....	134
5. 3. 3. Estudio de los Factores que Influyen en la Estabilidad de los Fenoles en Plasma Humano.....	151
5. 3. 4. Tratamientos de la Muestra de Plasma para el Análisis. Comparación de Diversos Tratamientos de Muestra de Plasma.....	166
5. 3. 5. Métodos Analíticos para Determinar Compuestos Fenólicos en Orina. Comparación de Diversos Tratamientos de Muestra.....	182
5. 3. 6. Estudios con Voluntarios Humanos. Medidas en Orina.....	187
6. CONCLUSIONES.....	195
7. BIBLIOGRAFÍA.....	199
8. ANEXOS.....	219

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Recientemente, los estudios sobre los efectos beneficiosos que aporta al organismo el consumo moderado de vino, a partir de la *Paradoja Francesa*, han tomado gran relevancia. Los resultados muestran correlaciones positivas entre grupos de población con menor incidencia de enfermedades cardiovasculares y el consumo moderado de vino, lo cual ha llevado a la *Food and Drug Administration* (FDA) a incluir el vino en sus recomendaciones dietéticas diarias.

El vino es un alimento típico de la dieta mediterránea, aunque su consumo ha disminuido considerablemente en los últimos años con la introducción de nuevos estilos de alimentación provenientes principalmente del mundo anglosajón. Por otro lado, el vino es continuamente desprestigiado en las campañas antialcohólicas y existe en la actualidad un rechazo social. Esto hace que a la hora de recomendar su consumo saludable haya que andar con mucha cautela.

Los estudios epidemiológicos aportan una valiosa información, no obstante, no dejan de ser el punto de partida para otra serie de experimentos que expliquen de una forma más directa cómo puede el vino actuar en el organismo para provocar un efecto saludable. Gracias al análisis químico se pudo comprobar que la diferencia fundamental entre el vino y otras bebidas alcohólicas es la presencia de compuestos fenólicos presentes en el vino procedentes de la uva de origen. Estos compuestos son eficaces antioxidantes, por lo que a ellos se les atribuye la potencial acción cardiosaludable del vino, ya que las reacciones oxidativas están en la base de numerosas enfermedades degenerativas, como aterosclerosis, cáncer, Alzheimer...

Para estudiar los efectos fisiológicos de los compuestos fenólicos presentes en el vino, se hacen necesarios ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* en orden a explicar las propiedades que se les atribuyen. Actualmente, diversos grupos de investigación desarrollan este tipo de ensayos, y hay evidencia de que estos compuestos manifiestan actividad como vasodilatadores, antiinflamatorios o incluso anticancerígenos. El problema a la hora de interpretar estos resultados es que no podemos perder de vista que el vino no es un medicamento, sino un alimento, y que es más importante el conjunto de sus componentes y el sinergismo que pueda existir entre ellos que la posible acción biológica que puedan presentar por sepa-

rado y que normalmente se manifiesta a dosis más altas de las que se dan en plasma tras el consumo de vino.

Por otro lado, todavía se conoce poco acerca de la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del vino y si estos compuestos pueden ser absorbidos por el organismo y ejercer su acción protectora allí donde sean necesarios. También es preciso estudiar de que manera son metabolizados, y si sus metabolitos presentan también los efectos fisiológicos beneficiosos atribuidos a los fenoles.

Para poder realizar este tipo de estudios farmacocinéticos, es necesario poner a punto una metodología lo suficientemente sensible que permita su determinación en fluidos biológicos como plasma y orina. Es fácil imaginar que los niveles de estos fenoles, ya de por sí bajos en el vino de partida, puedan quedar por debajo de los límites de detección de la mayoría de las técnicas analíticas.

De acuerdo con todo lo expuesto, el planteamiento del presente trabajo nace de la inquietud de conocer más profundamente los aspectos saludables del vino que puedan justificar la recomendación de su consumo con la base de un respaldo científico. En primer lugar se hace imprescindible una revisión bibliográfica exhaustiva para tener un conocimiento global de los estudios que se están realizando.

También es importante conocer el contenido fenólico de diferentes tipos de vinos, afinando cada vez más en la determinación de compuestos concretos. En este sentido, se pueden destacar algunos de ellos que han suscitado un interés particular por su potencial anticancerígeno, como el resveratrol.

Por último, la determinación de compuestos fenólicos en fluidos biológicos, con las dificultades que esto conlleva, resulta asimismo interesante: por un lado debido a la sensibilidad inherente a las técnicas analíticas, y por otro a la complejidad de las muestras.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1. CONSUMO DE VINO Y SALUD

Tan antigua como el vino es la creencia de que su consumo aporta un beneficio al organismo, aunque sólo sea el placer degustativo y una euforia suave y agradable. En las Sagradas Escrituras son frecuentes las alusiones al vino con motivo de festejos y banquetes, y como sinónimo de toda delicia y alegría. Por eso, el Cantar de los Cantares comienza con una exclamación: “*¡son mejores que el vino tus amores!*”; y el Eclesiástico afirma: “*¿Qué es la vida a quién le falta el vino, que ha sido creado para el contento de los hombres?*”.

Unida a esa conciencia hay otra que advierte que el vino es algo delicioso, pero con lo que hay que tener cuidado, porque puede llevar a la vergüenza de la embriaguez, como le ocurrió a Noé. Ambos conocimientos están recogidos con gran acierto en el Eclesiástico, donde se puede leer: “*Regocijo del corazón y contento del alma; es el vino bebido a tiempo y con medida. Amargura del alma, el vino bebido con exceso*”.

También en la antigüedad clásica, Hipócrates consideraba que: “*El vino es algo maravilloso, apropiado al hombre, si tanto en la enfermedad como en la salud se toma en justa medida con la constitución individual*”. Los griegos, en su filosofía dionisiaca, tomaban el vino con moderación, rebajándolo con agua en sus “simposium”, para lograr un equilibrio entre placer y orden y así facilitar la “ *bajada de las musas*”.

Unida a esa intuición popular, el vino ha sido empleado con fines médico-terapéuticos desde los albores de la Historia, entrando de esa manera a ocupar un lugar en la Historia de las Ciencias Sanitarias. En la civilización Babilónica (2.000 a.C.) era usado como vehículo para la administración de fármacos, práctica ésta que heredaron y continuaron siglos después griegos y romanos. De esta manera, el vino ha sido incluido a lo largo del tiempo en numerosos preparados farmacéuticos tradicionales, como son los vinos medicinales.

Los facultativos de la escuela médica de Salerno (s. XII) fueron los primeros en destilar el vino para obtener alcohol, siendo éste uno de los hechos fundamentales y más importantes de la Historia de la Farmacia.

A través del tiempo, y hasta fechas no muy lejanas, el vino se ha usado como vehículo que facilita la administración de ciertos principios activos. Como ejemplo de ello, citaremos el empleo de vinos quinados para combatir la anorexia.

Si Pasteur se refería al vino como “*la más higiénica de las bebidas*”, desde hace unos años el vino viene sufriendo una campaña de desprestigio debido al problema social del alcoholismo. Sin embargo, aunque la publicidad antialcohólica suele presentar una copa de vino tinto como advertencia de peligro, las estadísticas muestran que son las bebidas de elevada graduación, elaboradas a partir de destilados alcohólicos, las que aparecen más frecuentemente como agente causal de este mal.

2. 1. 1. Estudios Epidemiológicos

El vino es componente habitual de la dieta típica mediterránea, característica de países como España, Portugal, Italia y Francia. La publicación en los años setenta por *Ancel y Margaret Keys*, reconocidos expertos en Nutrición, del libro titulado *How to eat well and stay well. The mediterranean way*, a raíz de una estancia en la isla de Creta, así como las observaciones resultantes de los estudios epidemiológicos que señalan una menor incidencia de trastornos cardiovasculares en los países de la cuenca mediterránea, son el origen de la llamada dieta mediterránea. Según estos autores, esta dieta se caracteriza por incluir considerables cantidades de pescados, verduras y frutas, alimentos típicos como el ajo y la cebolla, el pan como alimento básico, junto con el empleo sistemático del aceite de oliva en la elaboración de los platos culinarios y el consumo, moderado pero diario, de vino tinto (*Álvarez-Sala Walter et al., 1996*).

La dieta mediterránea se ha relacionado tradicionalmente con la ingesta de grasa, su capacidad para modificar el patrón lipoproteico y para prevenir las llamadas enfermedades cardiovasculares. Es lo que se conoce como “hipótesis lipídica” (*Kinsella et al., 1990*). Es una alimentación rica en ácidos grasos insaturados, con los beneficios que esto conlleva a nivel cardiovascular.

Los estudios sobre la dieta mediterránea se han centrado principalmente en el consumo total de grasa y en la naturaleza de ésta. Hasta hace bien poco, no se ha tenido en cuenta la existencia de diferentes compuestos no nutritivos presentes en cantidades apreciables en los alimentos vegetales. Por ello, aún no se conocen

a la perfección los mecanismos en virtud de los cuales ejercen funciones beneficiosas para la salud (*Farré- Rovira y Frasquet-Pons, 1991*).

Los estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto los efectos saludables y beneficiosos que supone la inclusión del vino como componente habitual de la dieta, ya que en la cuenca mediterránea se da un índice de mortalidad debido a enfermedades cardiovasculares singularmente bajo, muy inferior al de otras zonas igualmente desarrolladas. Especialmente llamativo es el caso francés, conocido como “la paradoja francesa”.

En 1989 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó los resultados del proyecto MONICA, un estudio a escala mundial sobre la incidencia de enfermedades cardiovasculares en los países industrializados (*Renaud y Lorgeril, 1992*). En esta investigación, los factores epidemiológicos considerados fueron: la mortalidad debida a enfermedades cardiovasculares, los niveles plasmáticos de HDL, y los siguientes componentes de la dieta: pan, verduras, frutas, mantequilla, queso, grasas vegetales y vino. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que, a igualdad de otros factores de riesgo, existía una correlación entre un elevado consumo de grasas saturadas y el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. La excepción a este comportamiento la presentaba Francia, donde el consumo de grasas saturadas en la dieta era muy alto, por encima del 14-15% del total de las Kcal/día, y sin embargo el índice de este tipo de enfermedades era mucho menor que en otros países (como E.E.U.U. y el Reino Unido) con similar ingesta de grasas y a igualdad de otros factores de riesgo como el consumo de tabaco, hipertensión arterial, índice de masa corporal...

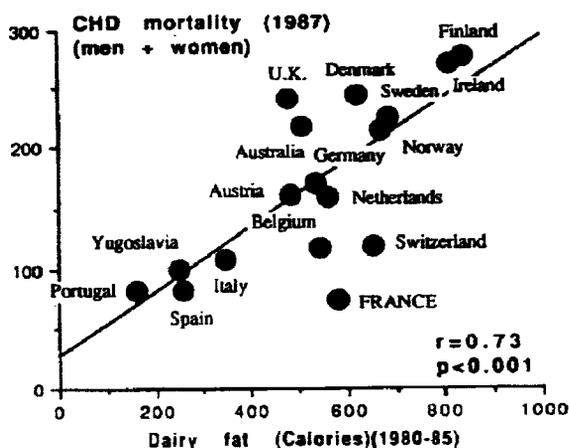


Fig. 1. Relación entre el consumo de grasa láctea (Dairy fat) y la incidencia de enfermedades cardiovasculares (*Renaud y Lorgeril, 1992*).

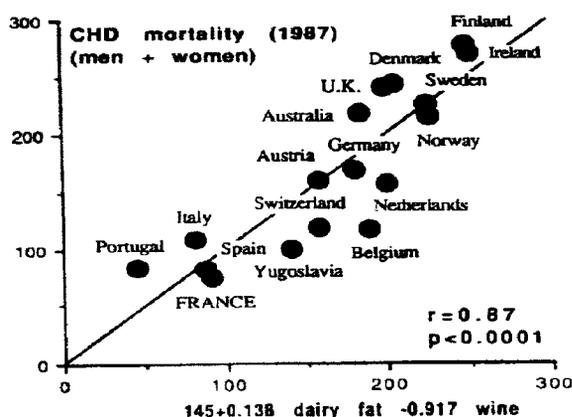


Fig. 2. Relación entre el consumo de grasa láctea (Dairy fat) y la incidencia de enfermedades cardiovasculares corregidas con el consumo de vino (Renaud y Lorgeril, 1992).

A este hecho tan sorprendente: bajo índice de mortalidad debido a enfermedades cardiovasculares a pesar del elevado consumo de grasa saturadas (que presentan determinadas regiones francesas, como Toulouse) se conoce como "paradoja francesa". La dieta que sigue la población de Toulouse se corresponde con el modelo típico de dieta mediterránea, que incluye un elevado consumo de pan y de aceites vegetales con gran variedad de frutas y verduras. Parte importante de esta dieta es el vino, que los franceses incluyen en sus comidas, siendo la ingesta media de 20-30 g. de alcohol por día (Renaud y Lorgeril, 1992).

Tras un análisis multivariante, Renaud y Lorgeril obtuvieron una relación en la que se observa que hay dos puntos, correspondientes a las poblaciones británica y francesa, que se alejan de la recta de mejor ajuste (Fig. 1). Sin embargo, si se incluye el factor "consumo de vino", tanto la población británica como la francesa corrigen su desviación, quedando incluidas en la recta de regresión (Fig. 2). Por tanto, el consumo de vino puede ser la explicación a estos resultados que en principio parecían anómalos.

Ya se había establecido con anterioridad una relación inversa entre el consumo moderado de vino y la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Marmot et al., 1981; Moore y Pearson, 1986). Posteriormente, una serie de estudios epidemiológicos (más de veinticinco) en distintos países obtuvieron resultados similares, llegándose a la conclusión de que el consumo moderado y regular de alcohol, esto es, uno o dos vasos diarios de vino, presenta un efecto cardioprotector; un vaso contiene entre 10-20 g. de alcohol etílico (Stockley, 1995).

Se ha podido comprobar una disminución de la morbilidad debida a enfermedades cardiovasculares en los consumidores moderados de vino frente a

grupos de personas abstemias y frente a otros grupos de personas que abusan del consumo de alcohol (*Klatsky et al., 1990*). Ello contribuye a demostrar que los efectos cardioprotectores del alcohol se manifiestan a una dosis moderada, siendo de sobra conocidos los efectos negativos para la salud que conlleva el abuso del alcohol, entre ellos la cardiomiopatía o enfermedad del músculo cardiaco. Otros autores (*Rimm et al., 1991; Lazarus et al., 1991; Colditz et al., 1985*) establecen que una dosis de alcohol de 30-50g/día ejerce un efecto cardioprotector de un 95%, observándose, sin embargo, efectos perniciosos a otros niveles. La dosis alcohólica diaria beneficiosa coincidiría precisamente con la que tomaban los habitantes de Toulouse (20-30 g/día).

En el mismo año 1992, el Dr. Jacques Caen, profesor de Medicina y director del Instituto Cardiovascular del Hospital Lariboisière de París, defendía en una conferencia los beneficios derivados del consumo moderado de vino acompañando a las comidas, ya que en su opinión puede llegar a reducir hasta en un 40% el riesgo de padecer una alteración cardiovascular (*Stockley, 1995*).

Para comprobar si era posible atribuir al alcohol un efecto cardioprotector al ser ingerido a pequeñas dosis, se llevaron a cabo diferentes estudios encaminados a establecer en qué medida actuaba el alcohol sobre el sistema cardiovascular (*Ticca, 1995*).

Aunque al principio no se establecieron diferencias entre la ingesta de vino y la de otras bebidas alcohólicas, pronto se pudo comprobar que las poblaciones que consumían regularmente cerveza, licores o destilados, no gozaban de los aspectos saludables de aquellas otras que tomaban vino (*Klatsky et Armstrong, 1993*). Así pues, se puso de manifiesto que, a pesar de todo, no se podía atribuir al alcohol exclusivamente los efectos beneficiosos que se observaban tras el consumo moderado de vino. Por ello, se empezó a sospechar que los efectos cardioprotectores manifestados en la población francesa no eran debidos sólo al alcohol. Esto condujo a estudiar aquellos integrantes de la composición del vino que no estuvieran presentes ni en la cerveza ni en las otras bebidas alcohólicas a los que se pudiera atribuir el distinto comportamiento observado, y esto se relacionó con los compuestos fenólicos.

El profesor Renaud, autor del famoso artículo que dio origen a la Paradoja francesa, afirmaba en un reciente Congreso (Madrid, Octubre 1999) que “no te-

nemos ningún indicio significativo de que el consumo de cerveza proteja frente a enfermedades cardiovasculares, no hay curvas en U” (*Renaud et al., 1999*).

Se siguen realizando estudios epidemiológicos y se encuentran otras enfermedades que también se pueden prevenir con un consumo moderado de vino, como úlcera gastroduodenal, artritis, osteoporosis... (*Goldberg et al., 1999*). Es el caso del freno de la degeneración macular, causa de ceguera en personas mayores de 65 años. Se realizó un seguimiento de unos tres mil individuos, de entre 45 y 74 años de edad que presentaban manchas sospechosas en su retina. Se esperaba encontrar que los consumidores de alcohol tuvieran más riesgo, y sin embargo se pudo ver que los que los consumidores moderados de vino reducían el riesgo de padecer la enfermedad en un 19% respecto a los abstemios (*Obisesan et al., 1998*).

Por otro lado se ha publicado que dietas altas en folatos y vitamina B6 reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares en la población femenina en un porcentaje de un 45% que aumenta hasta un 78% cuando la dieta se acompaña de una o dos copas de vino al día (*Rimm et al., 1998*).

En un estudio de cohortes se analizó la relación entre el consumo de vino tinto y los cánceres del tracto digestivo superior ya que este tipo de afecciones están directamente relacionadas con el abuso del alcohol. Sin embargo, los resultados fueron concluyentes en el sentido de que el consumo de vino protege a las mucosas gástricas del cáncer (*Gronbaek et al., 1998*).

2. 1. 2. Situación en España

En España se han llevado a cabo estudios epidemiológicos que relacionan la incidencia de las enfermedades cardiovasculares y la evolución de los hábitos alimentarios (*Serra-Majem et al., 1995*). Estos autores llamaron “paradoja española” al hecho de que aunque la ingesta de grasas saturadas ha aumentado significativamente en estos últimos años, tanto la incidencia como la mortalidad por enfermedades cardiovasculares han disminuido sensiblemente. En este sentido hay que considerar una serie de avances, como serían el control de la hipertensión, la mejora de las instalaciones sanitarias y la mayor sensibilización hacia formas de vida más saludables. Parece indudable que la dieta es, asimismo, otro de los factores implicados directamente en este descenso.

No todos los hábitos alimentarios han evolucionado positivamente hacia la prevención de los trastornos cardiovasculares, ya que, por ejemplo, ha aumentado el consumo de grasa saturada, debido principalmente a un aumento en la ingesta de productos cárnicos y lácteos. Sin embargo, sí disminuyó el aporte calórico total, la ingesta de sal, y se incrementó de forma notable el consumo de frutas y verduras, con el consiguiente aporte de vitaminas, minerales, fibra y sustancias antioxidantes. En general, se observa un descenso en el consumo de alimentos ricos en hidratos de carbono complejos tales como: pan, patatas, pastas y arroz; junto con un descenso en la ingesta de vino y azúcar. Los aumentos se observan en el consumo de cárnicos, en particular de volatería y cerdo, pescado, leche y queso, frutas y vegetales (Tabla 1).

Estos datos no son uniformes en todo el territorio nacional, apreciándose diferencias significativas entre el norte y el sur. En este sentido, se ha observado por ejemplo que: el consumo de aceite de oliva junto con otros aceites vegetales es mayor en el sur de la península, siendo mayor el consumo de productos cárnicos en el norte.

La tabla siguiente muestra los principales cambios de la dieta española entre los años 1960 y 1990 (*Serra-Majem et al., 1995*):

Alimentos	% Ingesta total de alimento en peso	
	año 1960	año 1990
Pan, patatas, arroz	43.8	20.4
Vegetales y frutas	19.1	28.4
Lácteos	13.3	22.8
Carne, pescados, huevos	10.0	19.7
Vino	7.8	4.0
Aceite	3.7	3.2

Tabla 1. Consumo de alimentos en España en 1960 y 1990 (*Serra-Majem et al., 1995*).

Aunque las conclusiones de los estudios epidemiológicos deben tomarse con cautela, sí resultan válidos para orientarnos en la importancia que tienen sobre la salud los hábitos alimentarios, ya que relacionan distintos hechos, como por

ejemplo que el aumento en el consumo de alimentos vegetales podría contrarrestar el exceso en el consumo de grasa saturada.

De todas formas, aunque el consumo de grasa saturada ha aumentado en España en los últimos años, no se llegan a alcanzar los niveles franceses y de otros países europeos que nos superan considerablemente (Fig. 1). Así, España queda junto con otros países de dieta mediterránea, situada en los niveles inferiores de morbilidad y/o mortalidad por alteraciones cardiovasculares.

2. 2. LA OXIDACIÓN Y LAS SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES

El oxígeno, componente vital para el ser vivo, una vez inhalado sufre un proceso de reducción gradual hasta que es metabolizado a agua, siendo el aceptor final de electrones de la cadena respiratoria aerobia, sistema bioenergético del organismo. Durante los procesos de transformación metabólica en los que interviene, se puede producir la formación de pequeñas cantidades de especies parcialmente reducidas que son intermediarios de reacción, tales como radicales superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno. Estos compuestos, conocidos como radicales libres, son altamente reactivos y pueden reaccionar con los lípidos de las membranas y otras estructuras celulares, ocasionándoles alteraciones oxidativas por la acumulación de peróxidos lipídicos. Tales productos peroxidados junto con otras posibles especies secundarias de oxidación de grasas (como malondialdehído y 4-hidroxinonenal), son altamente reactivos, pudiendo interactuar con diversos sustratos biológicos, como proteínas, aminas y ácidos nucleicos (*Kehrer, 1993*). Todas estas reacciones de oxidación son origen de procesos degenerativos en el organismo, tales como la arteriosclerosis, el desarrollo de tumores, o el simple envejecimiento (*Marnett et al., 1985*). Así, parece estar suficientemente comprobado que las LDL oxidadas interactúan con el endotelio vascular, hecho que va a desencadenar una serie de daños que son el origen de la placa de ateroma.

En otras palabras, la respiración celular, fenómeno imprescindible para el desarrollo de la vida, lleva unida la eventual producción de un daño por las posibles oxidaciones colaterales. Por lo tanto, la longevidad del ser vivo depende de su capacidad para metabolizar el oxígeno y de la eficacia de su sistema antioxidante.

La mayoría de los seres vivos disponen de sistemas de defensa eficaces que les protegen frente a este “estrés oxidativo”, de forma que en estado saludable, se mantiene un equilibrio redox (*Cutler, 1984*). El organismo humano dispone de un sistema de defensa propio, frente a la oxidación, constituido por diversos sistemas enzimáticos, entre los que destaca por su importancia la glutatióneshidrogenasa hepática, entre otros.

Sin embargo, con la edad va disminuyendo progresivamente la eficacia de este sistema defensivo, por lo que es de suma importancia un aporte exógeno de sustancias antioxidantes al organismo, que éste recibe gracias a los nutrientes de la dieta.

La dieta tiene una función fundamental en el mantenimiento de la salud y en la prevención de enfermedades; ello es debido a que los alimentos proporcionan al organismo nutrientes protectores, entre los que destacan las sustancias antioxidantes procedentes del reino vegetal. Una alimentación rica en sustancias antioxidantes juega un papel protector decisivo frente a los procesos degenerativos y el envejecimiento (*Doll y Peto, 1981; Ames, 1983*), ya que aporta una amplia variedad de compuestos capaces de moderar la peroxidación lipídica y por tanto de frenar el progreso de enfermedades crónicas (*Kinsella et al., 1993*).

Si desde hace tiempo son de sobra estudiados, debido a su acción antioxidante, los carotenoides, tocoferoles y vitamina C, hoy día hay que añadir otros compuestos de creciente interés como son: flavonoides, procianidinas, cumarinas, fitoalexinas... que se encuentran en alimentos de origen vegetal, y frecuentemente la bibliografía se refiere a ellos con el nombre de “fitoquímicos” (*Kanner et al., 1994; Kinsella et al., 1993; Fitzpatrick et al., 1993*). De este modo, estudios epidemiológicos avalan los beneficios saludables de dietas ricas en frutas y verduras (*Hertog et al., 1993; 1995; Jacob, 1999; Gaziano, 2000*).

Los compuestos fenólicos están ampliamente repartidos en los alimentos de origen vegetal, siendo las principales fuentes las frutas y las bebidas (zumos, vino, té, café) y en menor cantidad las verduras, legumbres y cereales (*Scalbert y Williamson, 2000*), sin olvidar otra fuente fundamental en la dieta mediterránea como es el aceite de oliva (*Edgecombe et al., 2000; Casas et al., 2001*). Se ha estimado que el consumo medio de los mismos, aunque es difícil hacer un promedio, es de alrededor de 1g/día, del cual los fenoles simples suponen un tercio y los

flavonoides los dos tercios restantes, siendo los más abundantes catequina y proantocianidinas (*Scalbert y Williamson, 2000*).

El vino es fuente de sustancias antioxidantes naturales, y en este sentido está demostrado que los polifenoles presentes en él tienen un elevado poder antioxidante (*Kinsella et al., 1993*). Actúan capturando los radicales libres, siendo ellos los verdaderos responsables de la acción cardioprotectora del vino, en medida mucho mayor que el alcohol (*Frankel et al., 1998*). La mayoría de los compuestos fenólicos presentes en el vino han demostrado poseer propiedades fisiológicas beneficiosas, actuando como compuestos cardioprotectores, anticancerígenos y antiinflamatorios, efectos que se basan en la estructura química que poseen estos compuestos que es ideal para capturar radicales libres, por lo que se supone que previene al organismo del daño oxidativo (*Rice-Evans et al., 1997*).

2. 3. LOS COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN LA UVA Y EN EL VINO. CLASIFICACIÓN GENERAL.

Los compuestos fenólicos son sustancias orgánicas naturales que sintetizan los vegetales, la mayoría de los cuales se consideran metabolitos secundarios, no esenciales para la vida de la planta. Normalmente presentan más de una función fenol, por lo que en general reciben el nombre de polifenoles. Con frecuencia aparecen en su forma glucosidada disueltos en el jugo celular, y también en forma de polímeros formando parte de estructuras celulares. Bajo el nombre de polifenoles queda englobado un grupo muy amplio de sustancias con gran diversidad de estructuras químicas (Fig. 4) y que desempeñan funciones muy variadas. Son en gran medida responsables de las propiedades de color, astringencia y flavor de los alimentos de origen vegetal.

Uvas y vinos presentan una amplia gama de compuestos fenólicos de muy diversas estructuras químicas, cuya cantidad total y la proporción en que aparecen depende de una serie de factores, como la variedad de uva, el área de producción, la añada, la climatología, las técnicas agrícolas y los métodos de vinificación (*Singleton y Essau, 1969*). Los distintos compuestos fenólicos que aparecen en uvas y vinos pueden ser clasificados atendiendo a dos grandes grupos: compuestos fenólicos no flavonoideos y compuestos fenólicos flavonoideos.

a) Compuestos fenólicos no flavonoideosÁcidos hidroxibenzoicos C₆-C₁Ácidos cinámicos C₆-C₃Estilbenos: Resveratrol C₆-C₂-C₆

En el vino los compuestos fenólicos no flavonoideos son aquellos que derivan de los ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámico (Fig. 3), y que en la mayoría de los casos se encuentran conjugados con alcoholes, azúcares o ácidos orgánicos.

El ácido benzoico y sus derivados se encuentran en vinos tintos en cantidades comprendidas entre 50 y 100 mg/L, mientras que en los vinos blancos están entre 1 y 5 mg/L. Se localizan en la pulpa de la uva, y su nivel es similar tanto en uvas blancas como tintas (*Singleton y Essau, 1969*).

Los hidroxicinamatos se encuentran en el fluido vacuolar, pasan al mosto por el simple estrujado del fruto y son los fenoles mayoritarios en el zumo de uva de casi todas las variedades (*Somers et al., 1987*). Químicamente son derivados de la estructura del ácido trans-3-fenilpropanoico, y se pueden subdividir en dos categorías; los derivados del ácido clorogénico y otros derivados conjugados

Los derivados del ácido clorogénico más abundantes en la naturaleza son los ácidos cafeico, p-cumárico y ferúlico, moléculas hidrosolubles y polares. Aunque en la naturaleza los cinamatos suelen presentarse en formas conjugadas, en el vino el proceso de maceración puede provocar la escisión de las macromoléculas. Así es frecuente encontrar en los vinos ácidos cafeico y p-cumárico provenientes de la escisión del éster cafeoiltartárico, hidroxicinamato mayoritario en vinos (*Clifford, 2000*).

La familia de los estilbenos incluye a todos aquellos polifenoles que presentan la estructura química 1,2-difeniletieno, siendo el resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) el compuesto principal. El resveratrol existe en dos formas isómeras, cis- y trans- (Fig. 3) que pueden aparecer glucosidadas y así se han detectado en uvas y vinos (*Waterhouse y Lamuela-Raventós, 1994*).

El término "resveratrol" se aplica por lo general a la forma trans, más estable que la cis, y que ha sido más estudiada. Sin embargo, es importante cuantificar ambos isómeros por separado porque la forma trans se isomeriza a la forma

cis bajo la acción de la radiación ultravioleta (Roggero y García-Parrilla, 1995). Ambos isómeros son precursores de distintos compuestos: oligómeros (dímeros, trímeros...) y polímeros que se forman por reacciones de condensación y deshidrogenación. Reciben el nombre genérico de “viniferinas”. La mayoría de estos compuestos se han aislado de cinco familias de plantas: Dipterocarpaceae, Vitaceae, Cyperaceae, Gnetaceae y Leguminosa (Sotheeswaran y Pasupathy, 1993). Es un carácter taxonómico de *Vitis vinifera* el hecho de que sólo se presenten monoglucósidos. Aunque los estilbenos abundan en el reino vegetal, las únicas fuentes comestibles hasta ahora conocidas son uvas y derivados, como vinos, y los cacahuets (Sobolev et al., 1995; Sobolev y Cole, 1999; Cassidy et al., 2000).

b) Compuestos fenólicos flavonoideos $C_6-C_3-C_6$

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, siendo los antioxidantes naturales de las plantas, ya que son capaces de capturar los radicales libres y de formar quelatos con los metales (Bors y Saran, 1987).

La estructura química base (Fig. 4), está constituida por dos anillos aromáticos unidos entre sí a través de un anillo de pirano, cuyo estado de oxidación va a servir para diferenciar las diferentes familias de compuestos. Es decir, los hidrógenos, grupos hidroxilos y cetónicos que pueden presentar los carbonos 2, 3 y 4 del anillo de pirano sirven para distinguir los diferentes grupos: antocianos, flavanoles, flavonoles, entre otros.

Los flavonoides pueden estar en forma libre, polimerizada con otros flavonoides o también unidos a azúcares, que son los llamados glicosil-derivados, a excepción de los flavanoles, que raramente se presentan en forma glucosilada (Hollman y Arts, 2000).

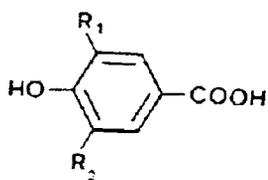
Todos estos compuestos se encuentran repartidos en la piel, semilla y tejido vascular de la uva. Los antocianos en particular, se encuentran confinados en las células del hollejo, exceptuando las escasas variedades de uvas tintoreras en las que también se hallan en la pulpa y son los responsables del color rojo de los vinos tintos. Durante el encubado se diluyen en el mosto los componentes de las partes sólidas de la uva, especialmente de los hollejos, y entre ellos los antocianos, siendo en esta fase de la vinificación cuando tiene lugar la extracción del color, ya que el medio alcohólico favorece el proceso de extracción.

Los compuestos flavanoles o flavan-3-ol, monómeros mayoritarios en la uva, están representados principalmente por la catequina, seguida por la epicatequina y la epigallocatequina así como por sus ésteres con el ácido gálico. Dichas sustancias tienen un elevado impacto sobre los caracteres organolépticos debido a que forman moléculas globulares que van a interactuar con las proteínas. Son los precursores de los llamados taninos condensados. Los monómeros y polímeros hasta el grado de polimerización de tetrámero son más amargos que astringentes. Por el contrario los polímeros de mayor grado de polimerización son más astringentes que amargos (*Lea y Arnold, 1978; Arnold et al., 1980*).

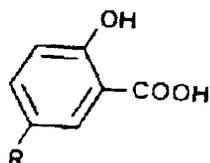
Las proantocianidinas, antiguamente llamadas taninos, son un grupo constituido por las combinaciones oligoméricas y poliméricas de los monómeros de los flavanoles (*Hollman y Arts, 2000*). Las procianidinas se encuentran en las semillas de la uva y también pasan al vino durante la fermentación. Las procianidinas B₁ (epicatequina-4-beta-8-catequina) y B₂ (epicatequina-4-beta-epicatequina) son los diestereoisómeros dímeros principales. En el proceso de envejecimiento de los vinos, los cambios de color que se observan están directamente relacionados con la formación de estos compuestos (*Santos-Buelga y Scalbert, 2000*).

Entre los flavonoles son de destacar por ser los más abundantes: quercetina, kaempferol, isorhamnetina y miricetina. En uvas, mostos y vinos, los flavonoles mayoritarios son quercetina y kaempferol (*Hollman y Arts, 2000*).

ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS

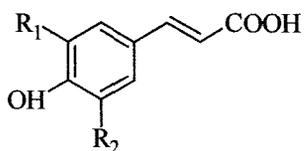


- $R_1 = R_2 = H$ Ác. P-Hidroxibenzoico
- $R_1 = OH, R_2 = H$ Ác. Protocatéquico
- $R_1 = OCH_3, R_2 = H$ Ác. Vainílico
- $R_1 = R_2 = OH$ Ác. Gálico
- $R_1 = R_2 = OCH_3$ Ác. Siríngico



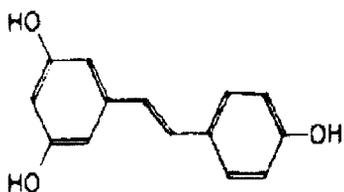
- $R = H$ Ác. Salicílico
- $R = OH$ Ác. Gentísico

ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS

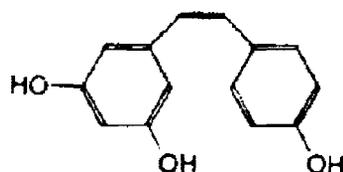


- $R_1 = R_2 = H$ Ácido p-cumárico
- $R_1 = OH, R_2 = H$ Ácido cafeico
- $R_1 = OCH_3, R_2 = H$ Ácido ferúlico
- $R_1 = R_2 = OCH_3$ Ácido sinápico

ESTILBENOS



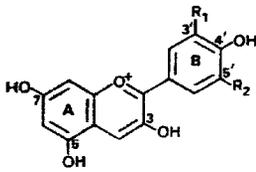
trans-resveratrol



cis-resveratrol

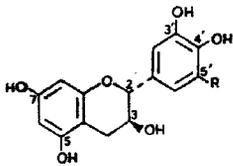
Fig. 3. Compuestos fenólicos no flavonoideos

ANTOCIANIDINAS

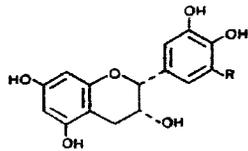


- R₁ = OH, R₂ = H Cianidina
- R₁ = OH, R₂ = OH Delfinidina
- R₁ = OCH₃, R₂ = H Peonidina
- R₁ = OCH₃, R₂ = OH Petunidina
- R₁ = OCH₃, R₂ = OCH₃ Malvidina

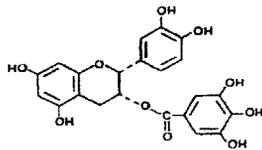
FLAVANOLES



- R = H (+)-Catequinas
- R = OH (+)-Galocatequinas

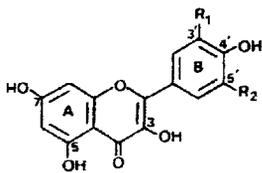


- R = H (-)-Epicatequinas
- R = OH (-)-Epigalocatequinas



- (-)-Epicatequina-3-galato

FLAVONOLES



- R₁ = H, R₂ = H Kaempferol
- R₁ = OH, R₂ = H Quercetina
- R₁ = OH, R₂ = OH Miricetina
- R₁ = OCH₃, R₂ = H iso-Ramnetina

Fig. 4. Compuestos fenólicos flavonoideos

2. 4. EFECTOS BENEFICIOSOS DEL CONSUMO DE VINO SOBRE EL ORGANISMO

Seguidamente, se analiza cómo el alcohol por un lado, y los diferentes compuestos fenólicos por otro, participan en el efecto beneficioso del vino ya comentado.

2. 4. 1. Efecto del Alcohol

Al hablar de los efectos beneficiosos que tiene la ingesta de alcohol no podemos olvidar que éstos sólo se manifiestan a dosis bajas. El abuso del alcohol lleva asociado graves reacciones adversas, como son un aumento en la tasa de hipertensión y de accidentes cerebrovasculares; por no hablar del alcoholismo crónico, que puede acarrear graves consecuencias fisiológicas como malnutrición, pancreatitis, cirrosis hepática... y que además se relaciona con la incidencia de algunos tipos de cánceres (*Tomera, 1999*).

Sin embargo, a dosis bajas, sí que han podido constatarse una serie de efectos beneficiosos, en concordancia con los datos obtenidos por los estudios epidemiológicos. Así, podemos señalar una serie de efectos cardioprotectores derivados del consumo moderado y habitual de alcohol, el cual actúa en los siguientes niveles:

Metabolismo proteico

Se ha postulado que el etanol podría contribuir indirectamente a la capacidad antioxidante del vino incrementado la biodisponibilidad de sus fenoles, ya que reduce las interacciones químicas entre las proteínas y los taninos del vino tinto (*Serafini et al., 1997*).

Metabolismo lipídico

El alcohol puede deber su papel cardioprotector, a dosis moderadas, al hecho de que estimula la síntesis hepática de las apolipoproteínas I y II que forman parte de las HDL (*Rimm et al., 1999*). Se ha podido comprobar que el etanol estimula la secreción de la apo A-I en cultivos de hepatocitos (*Amarasuriya et al., 1992*). De esta manera, el alcohol aumenta los niveles plasmáticos de HDL, cuyo efecto beneficioso radica en que estas lipoproteínas son las que retiran el exceso de colesterol circulante (*Stampfer et al., 1991; Thorton et al., 1983*).

Sin embargo, este hecho no resulta satisfactorio para explicar la paradoja francesa, pues en análisis serológicos se constató que la tasa de HDL no era mayor en la población francesa con respecto a otras poblaciones con alto índice de enfermedades cardiovasculares (*Renaud y Lorgeril, 1992*).

Hay estudios que han demostrado que el consumo moderado de alcohol reduce la actividad de la proteína transferidora de ésteres de colesterol, cuya función es intercambiar el colesterol de las HDL por los triglicéridos de las VLDL (*Tall, 1993*). El consumo moderado de alcohol está relacionado con un balance positivo de las HDL (*Hoffmeister et al., 1999*).

Además, el alcohol evita la oxidación de las LDL por los macrófagos mediante la inhibición de los hidroperóxidos que activan a la lipoxigenasa, enzima responsable de la peroxidación lipídica de las grasas poliinsaturadas que constituyen las LDL (*Stockley, 1995*).

Hemostasia

El alcohol a dosis moderadas, tiene una acción hemostática beneficiosa porque actúa a tres niveles:

- Disminuye la agregabilidad plaquetaria. De esta manera contribuye a evitar accidentes cardiovasculares trombóticos (*Renaud et al., 1992*). *Renaud y Lorgeril (1992)*, pusieron de manifiesto que la agregabilidad plaquetaria era bastante menor en una población francesa que en otra escocesa que no consumía habitualmente vino en sus comidas. El alcohol ha demostrado su efecto antiagregante plaquetario en varios ensayos *in vitro* (*Rand et al., 1989; Stubbs y Rubin, 1992*), y es directamente responsable de esta acción en mayor medida que los compuestos fenólicos del vino (*Pace-Asciak et al., 1996*).

- Disminuye la concentración de fibrinógeno, esto evita la formación de un coágulo circulante de fibrina que puede ser el origen de un accidente trombótico (*Meade et al., 1987; Kiechl et al., 1996*).

- Favorece la fibrinólisis, ya que ocasiona a corto plazo un aumento en los niveles del factor precursor del plasminógeno, el cual actúa activando a la plasmina, que es la responsable de la descomposición de la fibrina (*Meade et al., 1979; Stockley, 1995*).

Vasodilatación

El alcohol a dosis bajas actúa como vasodilatador periférico, y así favorece la disminución de la presión arterial media, factor de riesgo importante en las patologías cardiovasculares.

Además es un vasodilatador coronario, con lo cual favorece el flujo sanguíneo a este nivel y también reduce las posibilidades de espasmo de la arteria coronaria producido por el estrés.

Nivel hormonal

Insulina

El alcohol disminuye la concentración de insulina en sangre. Efecto éste positivo en un individuo sano, pues la insulina hace posible la formación de triglicéridos a partir de la glucosa, y un exceso de triglicéridos en plasma ocasiona un balance lipídico negativo, esto es, un aumento de las LDL, y una disminución de las HDL (*Savolainen et al., 1995*).

Se ha observado que los diabéticos dependientes de insulina presentan una mayor concentración en las LDL modificadas por peroxidación (*Stockley, 1995*).

Estrógenos

El alcohol favorece la producción de estrógenos. Se ha observado en mujeres pre-menopáusicas que los estrógenos contribuyen a reducir los niveles de colesterol en el plasma, lo que se ha relacionado con el hecho de que estas mujeres presenten una menor incidencia en trastornos cardiovasculares que los hombres (*Sack et al., 1994*).

Secreción gástrica

El alcohol en pequeñas dosis estimula las secreciones gástricas, en especial las secreciones ácidas, favoreciendo los procesos digestivos, por lo cual resulta muy adecuada la ingesta moderada de vino acompañando las comidas (*Flores et al., 1992*).

2. 4. 2. Propiedades de los Compuestos Fenólicos del Vino

Para poner de manifiesto los efectos beneficiosos que ejercen sobre el organismo los compuestos fenólicos, se realizan dos tipos de experiencias: unas llevadas a cabo con vino o extractos fenólicos y otras realizadas con compuestos fenólicos aisladamente. El primer paso es demostrar un efecto fisiológico en ensayos *in vitro*.

A continuación, se consideran globalmente los efectos fisiológicos observados, si bien se precisan estudios acerca de los efectos concretos de algunos fenoles en particular, porque no se trata de abordar el estudio de un medicamento sino de un alimento como es el vino, donde importa más el efecto conjunto o sinérgico de estos compuestos a dosis nutritivas que el que determinados compuestos presentes en él puedan presentar a dosis farmacológicas (*de la Torre-Boronat, 1998*).

a) Acción antioxidante

La capacidad antioxidante de los polifenoles se ha puesto de manifiesto en numerosos ensayos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Su acción antioxidante se ha estudiado especialmente en la inhibición de la oxidación de las LDL y en la inhibición de la peroxidación lipídica.

La mayoría de las investigaciones realizadas hasta la fecha acerca de la implicación en la salud de los antioxidantes presentes en la uva, se han centrado en los flavonoides, que al ser antioxidantes más apolares que los fenoles simples, pueden atravesar mejor las membranas biológicas.

Inhibición de la oxidación de las LDL

El vino tinto muestra una capacidad para inhibir la oxidabilidad de las LDL *in vitro* inducida por Cu^{++} superior a la del mosto, lo cual lleva a pensar que tanto el etanol como los compuestos fenólicos están implicados en este efecto (*van Golde et al., 1999*).

Se han llevado a cabo numerosos ensayos *in vitro* para estudiar la participación de los compuestos fenólicos presentes en el vino en la inhibición de la oxidación de las LDL. Sin embargo, se encuentran diferencias en los resultados finales de varios de ellos acerca del poder antioxidante de diversos compuestos.

Se ha podido comprobar experimentalmente que el consumo de vino tinto incrementa la capacidad antioxidante medible del suero, y por consiguiente aumenta la resistencia de las LDL a la oxidación *in vitro* (Maxwell et al., 1994).

Con el objeto de evaluar la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos se diseñaron ensayos *in vitro* con sistemas de oxidación de LDL utilizando iones cúpricos. La actividad antioxidante se evalúa por comparación con el antioxidante de referencia que es el α -tocoferol.

Frankel y colaboradores (1993), llevaron a cabo una serie de ensayos *in vitro*, y pudieron comprobar cómo los extractos fenólicos del vino tinto inhibían la oxidación de las LDL, cumpliéndose esto para extractos diluidos hasta cien veces con agua. El mismo grupo de investigadores, en un experimento posterior, determinó la capacidad de inhibir la oxidación de las LDL en presencia de iones cuproso, utilizando extractos fenólicos de veinte vinos diferentes. La metodología consistió en aislar las LDL de un individuo normolipidémico y medir mediante cromatografía de gases el hexanal formado por la oxidación de los ácidos grasos polinsaturados (n-6) que componen las LDL. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición con respecto al control. La conclusión a la que llegaron estos autores fue que era posible establecer una correlación entre el contenido fenólico de un vino y su poder antioxidante, presentando por ello los vinos tintos una capacidad antioxidante mayor que los blancos (Frankel et al., 1995). Este poder antioxidante también está correlacionado con el nivel total de antocianinas y flavonoles del vino (Meyer et al., 1997), aunque todos estos estudios llegan a la conclusión de que la actividad antioxidante es ejercida conjuntamente por los distintos compuestos fenólicos no por uno en particular (Frankel et al., 1993; 1995).

Estudios posteriores han tratado de establecer comparaciones entre la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos aislados. Así, la inhibición de las LDL es más efectiva con epicatequina, quercetina y trans-resveratrol, por este orden, comparada con un extracto complejo de fenoles y el α -tocoferol (Stachini et al., 1995). No obstante, en otros estudios de oxidación de las LDL llevados a cabo con una metodología muy similar en cuanto a su aislamiento y a la oxidación de las LDL, el resveratrol superaba en poder antioxidante a la catequina, epicatequina y epigallocatequina (Vinson et al., 1995b).

Los hidroxycinamatos son eficaces en la inhibición de la oxidación de las LDL. Son capaces de capturar los radicales libres que se generan en las fase lipí-

dica, siendo el ácido cafeico relativamente más eficaz que los ácidos ferúlico y p-cumárico (*Castellucio et al., 1996*).

También se comparó la actividad antioxidante de un extracto fenólico de vino tinto y del alfa-tocoferol para ver en qué medida eran capaces de inhibir la oxidación de las LDL catalizada por los iones cuprosos. El resultado fue que el extracto fenólico presentaba una actividad antioxidante más potente que el alfa-tocoferol y observan que los más potentes en este sentido son: catequina, epicatequina y miricetina. (*Kanner et al., 1994*). La inhibición de la oxidación de las LDL por (+)-catequina también ha sido puesta de manifiesto por otros autores (*Mangiapane et al., 1992*).

En otro estudio (*Teissedre et al., 1996*), se separaron las distintas familias de compuestos fenólicos en diferentes fracciones, comparándose el efecto antioxidante que tenía cada grupo sobre las LDL. Se llegó a la conclusión de que las diferentes fracciones presentaban distinto grado de efectividad frente a la oxidación. Los que presentaban mayor capacidad antioxidante pertenecen a la familia de las procianidinas, y son: los dímeros de procianidina B₂ y B₈, el trímero C₁, y los monómeros catequina, epicatequina y el flavonol miricetina.

También se ha comprobado la capacidad de diversos fenoles para inhibir la oxidación de LDL + VLDL (*Vinson et al., 1995a; 1995b*). El estudio *in vitro* produce curvas sigmoidales de respuesta cuyo segmento inicial representa una fase de latencia, correspondiente al consumo de los antioxidantes, sigue una fase de propagación y finalmente una parada de la oxidación. Se determina el tiempo de latencia, TL, es decir, el tiempo que tarda en manifestarse la oxidación, mediante la intersección entre las tangentes de los dos segmentos de curva iniciales. Cuanto mayor sea éste, mayor será la capacidad antioxidante del compuesto estudiado.

Para medir la capacidad antioxidante, se han determinado dos parámetros: IC₅₀ (μM) y CLT₅₀ (μM). El primero de ellos, IC₅₀ (μM), representa la concentración de antioxidante que consigue el 50% de inhibición; y el segundo, CLT₅₀ (μM), es la concentración que aumenta el tiempo de latencia en un 50% con respecto al control. Parece que CLT₅₀ (μM) es un índice más adecuado que el IC₅₀ (μM) para medir la capacidad antioxidante, ya que para evitar la oxidación, los compuestos deben, en primera instancia, unirse a las LDL; y la facilidad de unión a las LDL queda recogida por este parámetro. De hecho no se obtienen buenas correlaciones entre ambos, lo que nos indica que un compuesto puede ser buen inhibidor y, sin embargo, no unirse bien a las lipoproteínas. Todos los feno-

les ensayados, aumentaron el tiempo de latencia cuando se aumentaba su concentración (Vinson *et al.*, 1995b). En este estudio *in vitro*, el galato de epicatequina, flavonol presente en el té, presentaba la mayor actividad antioxidante de los fenoles testados. Y todos los fenoles estudiados, excepto la hesperidina y la genisteina, mostraban una capacidad antioxidante mucho mayor que el tocoferol, expresada como IC₅₀ (μM) .

Al medir el CLT₅₀ (μM), se encontraron resultados diferentes, debido probablemente a que la lipofilia de ciertos compuestos puede favorecer su actividad antioxidante, por lo que este parámetro podría ser más indicativo de lo que va a ocurrir dentro del organismo vivo.

Compuesto	IC ₅₀ (μM)	CLT ₅₀ (μM)
Galato de epigallocatequina (flavonol)	0.075	41.7
Epicatequina (flavonol)	0.187	71.8
Cloruro de cianidina (antocianina)	0.212	120
Quercetina (flavonol)	0.224	59.3
Ácido clorogénico (ácido fenólico)	0.296	108
Resveratrol (estilbeno)	0.332	59.1
Rutina (glucósido de flavanol)	0.512	108
Tocoferol (vitamina E)	2.40	54.4
Hesperidina (flavanona)	3.66	>200
Genisteina (isoflavona)	14.3	>200

Tabla 2. Medida de la Capacidad Antioxidante de Varios Compuestos Fenólicos (Vinson *et al.*, 1995b)

Al comparar diferentes fracciones fenólicas en dos sistemas frente a la oxidación de las LDL se ha podido comprobar cómo el resveratrol es más eficaz que los flavonoides en sistemas de oxidación inducida por cobre, pero menos efectivo que ellos como agente quelante frente a radicales libres. Además, extractos de vino dealcoholizados demostraron proteger a las LDL de la oxidación por los dos mecanismos (Frémont *et al.*, 1999).

Inhibición de la peroxidación lipídica

Aunque el mecanismo de acción aún no se conoce, se sabe que la acción antilipoperoxidante de los polifenoles depende de la posición de los grupos hidroxilos sobre los anillos de benceno y de la posibilidad de deslocalizar los electrones de los dobles enlaces conjugados, posibilidad existente en la molécula de resveratrol que así sería capaz de capturar los radicales peróxidos.

Se ha comprobado que los fenoles del vino en concentraciones de hasta 200 mg/L, inhiben la peroxidación lipídica catalizada por mioglobina, citocromo c e iones ascorbato (*Kanner et al., 1994*)

En otro ensayo, *Sato y colaboradores (1996)* estudian la capacidad de los compuestos fenólicos para capturar los radicales libres superóxido empleando treinta muestras de vinos entre tintos y blancos. Para ello midieron su capacidad reductora, comparándola con la de la enzima superóxido dismutasa. También establecen una correlación directa, mediante un análisis de regresión simple, entre el color del vino, su contenido fenólico y la capacidad de los constituyentes del vino de capturar los radicales superóxido. Los resultados que obtienen muestran que el vino tinto tiene una capacidad de capturar los radicales superóxidos entre 5 y 10 veces mayor que el vino blanco. Concluyen que un consumo moderado de vino tinto, entre 150-300 ml/día, podría suponer un suplemento de antioxidantes naturales equivalente a 50-100 mg de superóxido dismutasa pura. La consecuencia de esto podría ser una protección adicional de las células frente a los procesos oxidativos, pero son necesarios estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos para saber en qué medida se produce dicha protección (*Sato et al., 1996*).

Los flavonoides pueden reaccionar con radicales de oxígeno activos, como son los radicales hidroxilo (*Hussain et al., 1987*), iones superóxido (*Afanaslev et al., 1989*) y radicales peróxido (*Torel et al., 1986*). De esta manera pueden frenar la peroxidación lipídica en sus primeras fases, siendo por esto protectores del organismo frente a las oxidaciones de los lípidos y de las LDL promovida por los macrófagos y el cobre (*Mangiapane et al., 1992; Rankin et al., 1993*).

Los flavonoides son capaces de inhibir la peroxidación lipídica *in vitro* ya que atrapan los radicales hidroxilo y superóxido. Además, algunos flavonoides como quercetina y su glucósido rutina, pueden actuar como agentes quelantes *in vitro*, impidiendo la formación de especies reactivas de oxígeno mediante reaccio-

nes de Fenton (*Afanas'ev et al., 1989; Cook y Samman, 1996*). En este sentido, se ha descrito que la epicatequina es más eficaz en la captura de los iones superóxido que la catequina, y este poder aumenta con el grado de polimerización, siendo además las procianidinas de la serie A más efectivas que las de la B (*de Gaulejac et al., 1999*).

El efecto antioxidante del trans-resveratrol ha sido comparado *in vitro* con otros antioxidantes bien conocidos (quercetina, butilhidroxitolueno (BHT) y alfa-tocoferol) en sistemas de peroxidación lipídica inducida por iones ferroso. El trans-resveratrol era el antioxidante más efectivo; el posible mecanismo de acción propuesto se basa en la formación de un complejo resveratrol-iones ferroso, inhibiéndose así la peroxidación catalizada por dichos iones (*Blond et al., 1995*). Estudios más recientes confirman la inhibición de la peroxidación inducida por el resveratrol, pero establecen que su mecanismo de acción es similar al del tocoferol, esto es, interaccionando con el medio lipofílico donde captura iniciadores orgánicos (*Tadolini et al., 2000*).

Asimismo, otros compuestos relacionados con el resveratrol, como pueden ser sus glucósidos, han demostrado poseer cierta capacidad antioxidante, inhibiendo la peroxidación lipídica y la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (*Teguo et al., 1998*).

Finalmente, en un estudio con voluntarios se ha corroborado que el consumo de vino tinto reduce los parámetros oxidativos del suero, evitando la oxidación de las LDL y la peroxidación lipídica (*Estruch, 2000*).

b) Acción cardioprotectora

Los compuestos fenólicos pueden actuar como agentes cardioprotectores, ya que han demostrado *in vitro* poseer un efecto vasorelajante, antiagregante plaquetario e hipolipemiante. El mecanismo de acción se supone que puede estar relacionado por la capacidad antioxidante de dichos compuestos (*Soleas et al., 1997; Burns et al., 2000*).

Inhibición de la agregación plaquetaria

La capacidad de inhibir de la agregación plaquetaria se considera equivalente a un efecto protector preventivo, muchas veces buscado con la administración de fármacos antiagregantes, como el ácido acetilsalicílico. Los flavonoides

inhiben la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa de plaquetas y macrófagos, siendo inhibidores de la agregación plaquetaria y, como tales podrían reducir las tendencias trombóticas *in vivo* (Moroney et al., 1988).

Seigneur y colaboradores (1990), observaron que un consumo moderado de vino tinto disminuye la agregación plaquetaria y aumenta la concentración de colesterol HDL en plasma.

Los primeros estudios sobre la actividad antiagregante del resveratrol, se llevaron a cabo *in vitro* sobre células de rata (Kimura et al., 1983; 1985; Chung et al., 1992). El resveratrol es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria. Ambos isómeros de resveratrol, han demostrado ser capaces de inhibir la agregación plaquetaria inducida por colágeno *in vitro* (Bertelli et al., 1996a); de igual forma que otros compuestos relacionados con el resveratrol (Orsini et al., 1997). Además, ha mostrado ser eficaz en la prevención de la trombosis ya que es capaz de evitar la adhesión de monocitos al endotelio (Ferrero et al., 1998).

El mismo efecto antiagregante plaquetario puede conseguirse con el consumo frecuente de vino. Se realizó un estudio fisiopatológico para comprobar el posible efecto antiagregante del vino. Para ello, se produjo un daño en la arteria coronaria de un perro, de forma que le ocasionara una trombosis y una posterior embolia secundaria. Se comprobó que la administración de vino tinto por vía intragástrica (a una dosis de 4ml/Kg) conseguía inhibir completamente la trombosis y la consiguiente embolia, mientras que con la administración de alcohol o vino blanco a la misma dosis no se observaba este efecto. Posteriormente este estudio se realizó en humanos y de forma análoga la agregación plaquetaria disminuía hasta un 39% con el consumo de vino tinto, mientras que con el blanco no se observaba un efecto significativo (Ursini et al., 1997). En otros ensayos con similar procedimiento se ha constatado que dicha inhibición de la agregación plaquetaria también ocurre con zumo de uvas, pero no con zumos de otras frutas (Osman et al., 1998).

Se ha podido constatar en un ensayo con voluntarios que consumo de vino tinto inhibe la aterosclerosis en su primera etapa al evitar la adhesión de monocitos al endotelio (Estruch, 2000).

Efecto vasodilatador

El vino, especialmente el tinto, así como el zumo de uva no fermentado y los extractos del hollejo, producen una vasodilatación endotelial a través de un mecanismo de acción que favorece la producción de óxido nítrico (relajante endotelial). Este fenómeno es antagonizado por la N-metil-L-arginina, que es un inhibidor competitivo de la síntesis del óxido nítrico (NO) (*Fitzpatrick et al., 1993*). El incremento de la producción de NO, además de la vasodilatación, puede tener otros efectos, como la disminución de la agregación de las plaquetas al endotelio y entre sí. Dicho efecto se atribuye a los flavonoides del vino, y está en concordancia con otras observaciones anteriores, tanto epidemiológicas como experimentales (*Fitzpatrick et al., 1993; Andriambelason et al., 1998*).

Se ha demostrado cómo los flavonoides kaempferol, quercetina y rutina fueron capaces de producir una relajación vascular en ratas hipertensas. Los dos primeros también presentaron capacidad de evitar la vasoconstricción provocada por un modelo que inhibía la producción de NO (*Abeywardena y Head, 1996*). El efector vasodilatador del resveratrol se ha constatado asimismo en un modelo con aorta de rata (*Chen y Pace-Asciak, 1996*).

En un reciente estudio que utilizó tejidos de ratas, se llegó a establecer una correlación directa entre el efecto vasodilatador de los vinos tintos y su contenido en fenoles totales y en concreto con el contenido total de antocianinas (*Burns et al., 2000*).

Otro estudio efectuado con doce voluntarios humanos abordó el efecto del consumo de vino dealcoholizado o sin dealcoholizar sobre el endotelio. Se midió el flujo sanguíneo y la vasodilatación producida en la arteria braquial. Los resultados mostraron que los cambios están más relacionados con los restantes compuestos del vino distintos del etanol, pues la vasodilatación significativa que sigue al consumo de un vaso de vino evita el aumento de la presión arterial (*Agewall et al., 2000*).

Hipolipemiente

En estudios sobre el metabolismo lipídico (*Arichi et al., 1982*), se demostró que la administración por vía oral de resveratrol a ratas con hiperlipemia, era capaz de producir una disminución de los niveles de lípidos en sangre. La raíz de

Polygonum cuspidatum, de una elevada concentración en glucósidos de resveratrol, se utiliza en China y Japón en el tratamiento de la aterosclerosis y también con otros fines terapéuticos (Kimura et al., 1983, 1985).

El resveratrol promueve un aumento del cociente HDL / LDL. Esto quiere decir que se desplaza el balance lipídico de forma positiva para el organismo, ya que se incrementa la cantidad de colesterol que es transportado por las HDL para su metabolización en el hígado (Arichi et al., 1982; Kimura et al., 1983). También se ha comprobado que produce una reducción de los niveles de triacilglicéridos en plasma y una inhibición de la peroxidación lipídica en el hígado.

c) Efecto antiinflamatorio

Está relacionado con la capacidad de los compuestos fenólicos de inhibir la ciclooxigenasa (COX). La COX es la enzima que media la formación de prostaglandinas, (sustancias que, entre otras funciones, rigen los procesos inflamatorios del organismo), a partir del ácido araquidónico. Entre los diversos tipos de prostaglandinas que se forman las hay proinflamatorias y antiinflamatorias. La COX tiene dos isoformas conocidas:

COX-1: que origina las prostaglandinas de tipo inflamatorio

COX-2: que origina las prostaglandinas antiinflamatorias

Los fármacos antiinflamatorios pueden actuar inhibiendo ambas isoformas: se les conoce entonces como “no selectivos”, o bien inhibiendo selectivamente una de ellas. Es obvio que aquellos fármacos que inhiban selectivamente la isoforma primera tendrán menos efectos secundarios al no suprimir la síntesis de las prostaglandinas beneficiosas.

La quercetina y otros flavonoides son capaces de modificar la biosíntesis de los eicosanoides (precursores de prostaglandinas), ya que inhiben las enzimas oxidativas e hidrolíticas que intervienen en el metabolismo del ácido araquidónico, como: fosfolipasa A₂, ciclooxigenasa y lipoxigenasa; lo cual se traduce en una respuesta antiinflamatoria (Formica y Regelson, 1995).

Los estilbenos también son capaces de interferir en el metabolismo del ácido araquidónico de los leucocitos, de forma que frenan la síntesis de las prostaglandinas mediadoras de la inflamación (Kimura et al., 1985). Así los indígenas

de Perú empleaban en sus tratamientos curativos la raíz de un arbusto: *Cassia quinquangulata Rich.* de la familia Leguminosae, cuyo principio activo responsable de su actividad también es el resveratrol.

En estudios *in vivo* en ratas (*Jang et al., 1997*), se ha comprobado cómo el resveratrol es capaz de disminuir el edema en las dos fases de la inflamación: tanto en la fase aguda como en la crónica; con una eficacia similar a la indometacina y en mayor grado que la fenilbutazona. Su mecanismo de acción se realiza mediante la inhibición selectiva de la ciclooxigenasa. También es capaz de inhibir la proliferación de los leucocitos polimorfonucleares implicados en la inflamación (*Rotondo et al., 1998*).

d) Acción anticancerígena

El compuesto fenólico más estudiado por su potencial anticancerígeno ha sido el trans-resveratrol (*Jang et al., 1997; Jang et al., 1999; Carbo et al., 1999*). La acción fisiológica de la isoforma cis no ha sido tan extensamente estudiada como la trans. Se ha planteado que podría ser ella la responsable de la inhibición de la enzima quinasa, estando de esta manera relacionada con una actividad anticancerígena (*Jayatilake et al., 1993*).

En estudios *in vivo* con ratones se ha puesto de manifiesto la actividad quimiopreventiva del resveratrol frente al cáncer y cómo es capaz de frenar el proceso cancerígeno en las tres etapas: iniciación, promoción y progresión (*Jang et al., 1997*). Además, se compara la acción del resveratrol con la de otros agentes quimiopreventivos, como: ácido acetilsalicílico, indometacina, piroxicam y sulindac, todos ellos fármacos incluidos dentro de la clasificación de los AINES (antiinflamatorios no esteroideos). Estos fármacos, al igual que el resveratrol, actúan mediante un mecanismo de acción similar, que consiste en la inhibición de la ciclooxigenasa, COX.

Otro derivado glucosidado de los estilbenos es el piceatannol, (E)-(3,5,3',4'-tetrahidroxiestilbeno)-3-O-beta-glucósido. Este compuesto también es sintetizado en cultivos celulares de *Vitis vinifera*. Es un conocido inhibidor de la enzima tirosinaquinasa, y es activo como agente antileucémico (*Teguo et al., 1996b*).

Los efectos anticancerígenos del resveratrol se han estudiado en las tres etapas que se diferencian en el proceso canceroso, que son (*Jang et al., 1997*):

1) Iniciación

El resveratrol evita los daños producidos por los radicales libres, ya que al reaccionar con ellos los inactiva impidiendo que puedan dañar las estructuras celulares. De esta manera el resveratrol actúa como un agente antimutagénico. Este efecto es dosis-dependiente, o sea que al aumentar la dosis aumenta la actividad.

Por otro lado el resveratrol induce la activación de la quinona reductasa, que es una enzima implicada en las reacciones metabólicas de fase II, encargadas de detoxificar el organismo de agentes extraños.

2) Promoción

El resveratrol frena la promoción tumoral en grado menor que la indometacina pero más eficazmente que el ácido acetilsalicílico.

La ventaja del resveratrol es que inhibe selectivamente la isoforma COX-1, mientras que la indometacina no es selectiva y por tanto presenta más efectos secundarios. Además, la detención de la promoción se debe a la inhibición de la hidroxidroxidasa, enzima que interviene en el proceso cancerígeno.

3) Progresión

Se comprobó también que el resveratrol frenaba la proliferación de las células tumorales de forma dosis-dependiente. Y su posible explicación es que el resveratrol estimula la formación de granulocitos y macrófagos. Se verificó cómo frenaba el crecimiento de tumores en cánceres de piel y el desarrollo de lesiones preneoplásicas en glándulas mamarias en ratones.

La noticia de que el resveratrol tiene posibilidades de ser un buen fármaco anticancerígeno tuvo una gran resonancia en los medios de comunicación, de manera que ha trascendido los ámbitos científicos causando un gran impacto en el público en general. Sin embargo hay que ser cautos con este tipo de publicidad, ya que los estudios sobre la actividad anticancerígena del resveratrol todavía se encuentran en fase preliminar, y de aquí a que se pueda comercializar un medicamento con resveratrol como principio activo aún queda un largo camino. Actual-

mente, los estudios acerca de la acción del resveratrol como agente antiproliferativo frente a diversos tipos de cánceres están poniendo de manifiesto nuevas propiedades de este compuesto (Cadenas y Barja, 1999; Miloso et al., 1999; Frémont, 2000).

El vino tinto diluido ha mostrado ser más eficaz en detener el crecimiento y proliferación de células humanas cancerosas en cultivos que el resveratrol o la quercetina por separado, hecho que refuerza la hipótesis del efecto sinérgico de todos los compuestos presentes en el vino, aunque se precisan más estudios sobre los mecanismos de acción (Elattar y Virji, 1999).

Las proantocianidinas se han relacionado con la prevención de diversos tipos de cáncer tanto en ensayos *in vitro* como con animales (Santos-Buelga y Scalbert, 2000).

2. 5. EL RESVERATROL EN LA UVA Y EN EL VINO.

Frente a situaciones de estrés, como heridas o infecciones por organismos patógenos, determinadas plantas reaccionan sintetizando unos compuestos llamados fitoalexinas, las cuales se caracterizan por sus propiedades curativas y su papel protector frente a los agentes tóxicos. Son compuestos post-infeccionales, cuya síntesis implica la inhibición de un sistema represor, o la activación de un sistema enzimático. Se acumulan tras una infección y frenan el desarrollo del agente patógeno. Así, en uvas resistentes al hongo *Botrytis cinerea* aparecen las fitoalexinas, de tipo estilbeno, resveratrol y viniferinas (Maestro-Durán et al., 1993).

Los primeros estudios que se hicieron sobre el resveratrol, se referían a su papel como fitoalexina en la vid, pues como tal es sintetizado en la planta en respuesta a una infección fúngica, especialmente en las hojas y en las partes leñosas (Langcake y Pryce, 1976; Bavaresco et al., 2000). Se puso de manifiesto cómo el resveratrol tenía un papel de defensa fundamental frente a la podredumbre gris causada por *Botrytis cinerea* (Langcake y McCarthy, 1979; Creasy y Coffee, 1988).

El resveratrol se sintetiza en el raspón, pepitas y hollejo de las uvas, desde donde puede pasar al interior del grano. Su síntesis se ve afectada por condiciones ambientales, tales como la humedad (ya que al aumentar ésta se espera un au-

mento del ataque de hongos), la irradiación ultravioleta (*Langcake y Pryce, 1977*), y el estrés sufrido por la planta (*Langcake, 1981*), como sería el caso de heridas o presencia de microorganismos patógenos.

A partir de la postulación de la *Paradoja Francesa* se comenzó a relacionar el poder antioxidante del resveratrol con los efectos beneficiosos asociados al consumo de vino tinto (*Siemann y Creasy, 1992*). El interés por este compuesto creció de forma espectacular a partir de la publicación de resultados que demostraban sus propiedades como anticancerígeno y antiinflamatorio (*Jang et al., 1997*).

Existe un gran interés en determinar el resveratrol y sus derivados en todo tipo de vinos, siendo innumerables los estudios que se han realizado en este sentido. Con tal objetivo, se han desarrollado varios métodos para la medida de resveratrol en vinos. Algunos de estos métodos se basan en técnicas de cromatografía gaseosa (CG) pero la mayoría emplean la cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE). Así, se ha empleado la técnica de la cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (*Lamikanra et al., 1996*) y con detector de espectrometría de masas (*Jeandet et al., 1993; Goldberg et al., 1994; 1995; Soleas et al., 1995*). En las técnicas con cromatografía líquida se han empleado diversos detectores, como de fluorescencia (*Pezet et al., 1994; Pezet y Cuenat, 1996*), electroquímico (*McMurtrey et al., 1994; McMurtrey, 1997*) o de fotodiodos (*Lamuela-Raventós et al., 1995*). La fluorescencia también se ha empleado en la determinación en vinos de otros estilbenos, como el pterostilbeno (*Pezet et al., 1994*), trans- ϵ -viniferina, glucósido de trans-resveratrol (*Jeandet et al., 1997*) y trans-astringina (3'-OH-trans-piceido) (*Carando et al., 1999*).

El empleo de un gradiente y columna de fase reversa acoplado a detector de fotodiodos ha sido destacado como una de las técnicas más adecuadas para la determinación de resveratrol (*Soleas et al., 1997a*).

El contenido en resveratrol de un vino está condicionado por una serie de factores que podemos clasificar en dos grupos: por un lado la presencia del resveratrol en la uva de origen de ese vino, y por otro lado todo el proceso de elaboración del vino.

Respecto a la variedad de uva, se han registrado diferencias en los niveles de resveratrol en distintas variedades, como se muestra en la Tabla 3, donde se

puede ver que destaca sobre todas la variedad Mourvèdre por su alto contenido en trans-resveratrol al comparar con los demás vinos analizados (*McMurtrey, 1997; Roggero y Archier, 1994; Romero-Pérez et al., 1996b*).

Variedad	Cita	gl-t-Resv	gl-c-Resv	t-Resv	Total
Chardonnay	(3)	0-0.119	0-0.044	0-0.128	0-0.225
Sauvignon blanc	(3)	0-0.176	0-0.00176	0-0.069	0-0.369
Riesling blanco	(3)	0.033-0.235	0-0.066	0-0.169	0.057-0.390
Macabeo	(3)	0.111-0.268	0.002-0.055	0.002-0.181	0.189-0.447
Albariño	(3)	0.031-0.206	0.010-0.069	0.098-0.298	0.253-0.522
Parrellada	(3)	0.222-0.397	0.050-0.110	0.059-0.258	0.235-0.523
Xarel.lo	(3)	0.263-0.397	0.114-0.174	0.252-0.452	0.802-1.089
C. Sauvignon 1991-1993	(1, 2)	4.0	(-)	0.53-4.44	(-)
Merlot 1991-1993	(1)	(-)	(-)	3.30-5.78	(-)
Pinot Noir 1990-1992	(1, 2)	5.0	(-)	3.72-8.70	(-)
Zifandel 1991	(1)	(-)	(-)	1.38-4.90	(-)
C. Franc 1990	(2)	0.0	(-)	0.5	(-)
Mourvedre 1990	(2)	14.5	(-)	4.8	(-)
Gamay 1992	(2)	0.0	(-)	2.5	(-)

Tabla 3. Niveles de resveratrol (mg/L) en vinos monovarietales

(-) los autores no analizaron este compuesto

(1)*McMurtrey, 1997*; (2)*Roggero y Archier, 1994*; (3)*Romero-Pérez et al., 1996b*

gl-t-Resv: glucósido de trans-resveratrol

gl-c-Resv: glucósido de cis-resveratrol

t-Resv: trans-resveratrol

c-Resv: cis-resveratrol

En la Tabla 4, se muestran los niveles de resveratrol en una serie de mostos de distintas variedades de uva blanca (*Romero-Pérez et al., 1999*). Se puede ver que en los mostos de la cosecha de 1993 las variedades con contenidos más altos de resveratrol total fueron Xarel.lo y Parellada. También se muestra que los niveles de resveratrol de mostos de la misma variedad (Chardonnay) y bodega, varían de una añada a otra. Estos datos corroboran la influencia de la variedad de

uva y de la añada como factores que afectan a los niveles totales de resveratrol en los vinos.

Variedad	gl-t-Resv	gl-c-Resv	t-Resv	c-Resv	Total
Macabeo 1993	0.08	0.19	0.03	nd	0.30
Xarel.lo 1993	0.17	0.92	0.05	nd	1.14
Parellada 1993	0.28	0.86	0.05	nd	1.19
Chardonnay 1993	0.10	0.12	0.06	nd	0.28
Chardonnay 1994	0.07	0.21	0.04	nd	0.32
Chardonnay 1995	0.27	0.28	0.13	nc	0.68

Tabla 4. Niveles de los glucósidos de resveratrol, monómeros y resveratrol total (mg/L) en zumos de uva de distintas variedades (Romero-Pérez et al., 1999).

nd: no detectado; nc: no cuantificado

En el ámbito nacional, merece la pena destacar un estudio en el que se analizaron vinos blancos varietales españoles de siete variedades de uva. Las variedades de uva son Albariño, Chardonnay, Macabeo, Xarel.lo, Parellada, Riesling y Sauvignon blanc. Se determinaron los niveles totales de resveratrol (trans-, cis-, y ambos glucósidos). Se comprobó que los vinos de la misma variedad, aunque procedentes de diferentes bodegas y añadas, tenían similares niveles de trans-resveratrol y su glucósido. Además, tanto el análisis múltiple de la varianza (MANOVA) como el análisis de componentes principales (PCA) demostraron que el trans-resveratrol y su glucósido pueden ser marcadores taxonómicos de vinos blancos. Los vinos que presentaban las concentraciones más altas de resveratrol total eran de la variedad Xarel.lo, mientras que los de Chardonnay resultaron ser los de menor contenido de resveratrol total. También se pueden correlacionar los niveles de resveratrol con la resistencia de las variedades empleadas a las infecciones fúngicas, porque Xarel.lo es una variedad bastante resistente mientras que Chardonnay es de las más sensibles (Romero-Pérez et al., 1996a). Otros autores también han relacionado la capacidad de sintetizar resveratrol con la resistencia de la planta a las infecciones (Bavaresco et al., 1997).

2. 5. 1. Botrytis y Síntesis de Resveratrol en la Uva

De las distintas plagas de hongos que atacan a los cultivos víticos, quizás la más temible sea la infección por *Botrytis cinerea*, conocida como "podredumbre gris". Así una infección por éste u otro agente patógeno (como *Plasmopara viticola*) va a inducir la síntesis de resveratrol (Langcake, 1981; Langcake y Price, 1976). Pero no siempre un mayor grado de infección va a estar directamente relacionado con un incremento en los niveles de resveratrol, ya que en muestras de vinos de doce añadas se pudo ver cómo en los años de intensa infección por *Botrytis* el contenido en resveratrol era bastante bajo, mientras que los años de escasa infección se correspondían con los mayores contenidos en resveratrol (Jeandet et al., 1995b). Este hecho es explicable porque cuando *Botrytis* se desarrolla en gran extensión, produce grandes cantidades de una enzima, lacasa, que libera al exterior. Ésta oxida estilbenos, degradando el resveratrol que la planta había sintetizado (Adrian et al., 1998). Se ha demostrado la presencia de *Botrytis* en uvas aparentemente sanas (Bessis et al., 1996). En esta situación el hongo induce la síntesis de resveratrol, pero no está lo suficientemente desarrollado como para sintetizar enzimas que lo degraden, y así los niveles de resveratrol son mayores (Jeandet et al., 1995). Por tanto, se puede decir que el contenido en resveratrol es el resultado de un equilibrio entre la cantidad producida por la planta (en lo cual interviene la inducción debida al hongo) y la extensión de su degradación por el propio *Botrytis* (Adrian et al., 1998).

En cultivos celulares estériles de células de *Vitis vinifera*, se ha observado que se producen resveratrol y otros glucósidos de estilbenos sin haber infección fúngica. El estrés abiótico, como la luz ultravioleta, es suficiente para estimular la actividad de la enzima estilbenosintasa en las membranas de las Vitaceae (Sbaghi et al., 1995; Teguó et al., 1996b).

2. 5. 2. Influencia del Clima sobre el Contenido de Resveratrol en el Vino

Las condiciones climatológicas influyen en el desarrollo de la uva y su contenido en resveratrol, principalmente, por dos mecanismos: la humedad y la radiación solar.

Un alto índice de humedad favorece el crecimiento de *Botrytis*, y la presencia de este hongo induce a la síntesis de resveratrol por la vid como ya se ha explicado.

Por otro lado, el número de horas de sol, así como su intensidad, determinan la cantidad de radiaciones ultravioleta que recibe la planta. Este hecho está relacionado con los equilibrios isoméricos entre las formas *cis* y *trans* del resveratrol y sus glucósidos (*Roggero y García-Parrilla, 1995; Lamuela-Raventós et al., 1995*).

2. 5. 3. Influencia de los Tratamientos Enológicos sobre el Contenido de Resveratrol en el Vino

El mayor contenido en resveratrol en los vinos tintos en relación con los blancos, donde resulta claramente inferior (*Goldberg et al., 1994; Mattivi, 1993; Mattivi y Nicolini, 1993*) se explica porque la elaboración de vinos tintos y blancos difiere en que en la vinificación en tinto la fermentación se realiza en presencia de los hollejos que es donde se encuentra el resveratrol y por tanto su extracción será mucho mayor en este tipo de vino. La maceración del mosto en presencia de los hollejos incrementa significativamente el contenido en resveratrol, obteniéndose una concentración hasta diez veces mayor cuando se compara con vinos no macerados (*Jeandet et al., 1995a*).

Así, alargando el tiempo de maceración se obtienen tintos con un contenido en resveratrol mayor que otros de elaboración más rápida. En el proceso de vinificación en blanco el prensado de la uva es anterior a la fermentación y parece que puede favorecer la extracción de resveratrol de las partes sólidas de la uva (*Mattivi y Nicolini, 1993*).

El contenido final de resveratrol en un vino también puede estar condicionado por algunas operaciones tecnológicas previas a la fermentación. Cuando el mosto tinto se somete a una hiperoxidación, los niveles de *cis*- y *trans*-resveratrol disminuyen hasta un 50% respecto a un vino control en el que este proceso no se realiza. Por el contrario la adición de SO₂ o ácido ascórbico en la fase previa a la fermentación inhibe la oxidación de resveratrol y sus niveles resultan mayores que los del vino control (*Castellari et al., 1998*).

El trans-resveratrol, cis-resveratrol y ambos glucósidos están relacionados entre sí por una serie de equilibrios químicos, desde su síntesis en la uva hasta su presencia en el vino. Este hecho ha sido puesto de manifiesto realizando un seguimiento de los cuatro compuestos durante la vinificación en tinto de vinos italianos (*Mattivi et al., 1995*). Al inicio de la fermentación el isómero cis- se encuentra en concentraciones muy bajas, el trans- en concentraciones mayores, siendo las formas dominantes los glucósidos en especial el cis- (*Jeandet et al., 1995a*). Estos mismos resultados se han obtenido en otro estudio al medir mostos de uvas blancas (Tabla 4), donde los niveles de cis-resveratrol quedan por debajo del límite de detección (*Romero-Pérez et al., 1999*). Cuando acaba la fermentación las formas libres son las mayoritarias, sobre todo el trans-resveratrol, seguido de cerca por el cis. Idénticos resultados se obtienen durante la fermentación de dos vinos tintos franceses de dos variedades: Grenache y Mourvedre. Se observa que al principio de la maceración difunden rápidamente los glucósidos, especialmente el cis-, siendo este fenómeno más rápido para la variedad Grenache. Al cabo de 10-12 días ambos vinos alcanzan el mismo nivel de resveratrol total (*Roggero, 1996*). Los cambios durante la fermentación en las concentraciones de las cuatro especies de resveratrol están relacionados con tres factores:

1. La extracción de estos compuestos de la uva es más rápida para los glucósidos porque son más solubles que las formas libres y más abundantes en la piel de la uva que los monómeros (*Roggero y García-Parrilla, 1995*). La extracción de las formas libres es más lenta y se ve favorecida por el incremento de etanol que ocurre durante la fermentación (*Mattivi et al., 1995*).
2. La hidrólisis ácida o enzimática (actividad beta-glucosidasa de las levaduras) de los glucósidos va a provocar el aumento de los niveles de las formas libres de resveratrol (*Pezet y Cuenat, 1996*).
3. También ocurren isomerizaciones cis/trans debidas a las radiaciones ultravioletas que favorecen el desplazamiento isomérico a la forma cis-resveratrol (*Roggero y García-Parrilla, 1995*).

El estudio de los vinos franceses se continuó durante el envejecimiento de los vinos, y se pudo ver que en la variedad Grenache comenzaba a disminuir el resveratrol al final de la fermentación, siendo esto aún más acusado durante la fermentación maloláctica. Estas pérdidas no se observaron en el caso del vino de variedad Mourvedre, y vinos de esta variedad de varios años de edad conservan

niveles similares de resveratrol total. De todo esto se deduce que los niveles finales de resveratrol de un vino no sólo dependen de la riqueza de la uva de partida, sino también de otros procesos aún no bien establecidos, que ocurren durante el envejecimiento del vino (Roggero, 1996).

Los vinos blancos obtenidos a partir de mostos que han sufrido un proceso oxidativo (como sería el caso de la crianza oxidativa o fisicoquímica de los vinos generosos), pueden perder resveratrol en un orden igual o superior al 50% (Mattivi y Nicolini, 1993; Martínez-Ortega, 1997; Martínez-Ortega et al., 2000a).

Los tratamientos de clarificación y filtración también pueden influir en el contenido final de resveratrol en el vino, pues se ha comprobado que al disminuir el número de dichos tratamientos, el contenido en resveratrol es mayor (Mattivi y Nicolini, 1993).

Algunos de los materiales que se usan en el proceso de clarificación pueden afectar a la concentración de resveratrol en el vino, especialmente a los monómeros de resveratrol. Por ejemplo, bentonita, caseína y gelatina causan un ligero descenso, en torno a un 2-5%, en la concentración final de resveratrol. La sílice origina pequeñas pérdidas de ambos isómeros, y las mayores pérdidas, superiores a un 40%, se producen por el empleo de carbón activo o PVP (Goldberg et al., 1997; Castellari et al., 1998; Soleas et al., 1995).

En el filtrado hay que considerar que los filtros de celulosa retienen el trans-resveratrol pero no el cis-resveratrol, hasta el punto de poder separar ambos isómeros cuando la filtración se repite (Goldberg et al., 1997).

La estabilidad del resveratrol a lo largo del tiempo parece que está condicionada en gran medida por las condiciones de conservación, distribución y almacenamiento del vino. De hecho midiendo la estabilidad del resveratrol a lo largo del tiempo se observó que, en contra de lo que se pensaba, los niveles de resveratrol no disminuían con el tiempo, pues en doce añadas aparecían concentraciones más altas en vinos más viejos que en otros más jóvenes, siendo el contenido en resveratrol independiente de la edad del vino (Jeandet et al., 1995a).

Asimismo, se ha estudiado la influencia de la temperatura, llegándose a la conclusión de que a temperaturas altas, entre 18-30°C, se puede producir un descenso en los niveles de trans-resveratrol en vinos con baja sulfatación y alto pH.

Mientras que a temperaturas bajas parece ser que dicho nivel se mantiene estable (Mattivi y Nicolini, 1993).

2. 6. BIODISPONIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DEL VINO

Los datos sobre absorción y biodisponibilidad de los fenoles en humanos son escasos y muestran la necesidad de más investigaciones sobre el paso de los fenoles a través del tracto gastrointestinal, su absorción y metabolismo. En general, podemos decir que, aunque existe evidencia de que se produce la absorción de estos compuestos, al ser los datos tan escasos, todavía permanece sin aclarar si permanecen en el cuerpo en la forma química apropiada y durante el tiempo suficiente para realmente suministrar una protección *in vivo* (Robards et al. 1999).

La biodisponibilidad de un principio activo indica la cantidad, velocidad y la forma en que llega a la circulación sistémica, y por tanto, si está disponible para acceder a los tejidos y producir un efecto. Depende no sólo de la absorción, sino también de la distribución y la eliminación (Flores et al., 1992).

La medida en plasma de un principio activo es una herramienta indispensable para el estudio de la farmacocinética del mismo pues, registrando las concentraciones plasmáticas en función del tiempo, se elaboran las curvas de niveles plasmáticos que miden tanto la absorción como la eliminación. Estas medidas de biodisponibilidad son necesarias para conocer si los compuestos fenólicos pueden ser asimilados y, así, ejercer *in vivo* las funciones protectoras que se les atribuyen.

El plasma es el líquido extracelular de la sangre. Se encuentra en continuo intercambio con el líquido intersticial a través de los poros de la membrana de los capilares. Dicha membrana es muy permeable a todos los solutos salvo a las proteínas, por lo cual, ambos líquidos tienen una composición similar aunque la concentración de proteínas es mayor en el plasma. En términos medios el volumen total de sangre en un individuo adulto es de unos cinco litros, constituyendo el plasma un 60%. Se estima que en sangre arterial el pH del plasma es 7.40 y en sangre venosa es 7.35 (Guyton y Hall, 1997).

La eficacia de la absorción de los flavonoides en el tracto intestinal dependerá de la estructura química particular de cada compuesto, aunque poco se cono-

ce todavía sobre ello (*Terao, 1999*). Hay estudios de biodisponibilidad *in vitro*, es decir, se evalúan posibles metodologías pero todos los ensayos se hacen con patrones en disolución. También hay estudios en ratas, y son escasos en humanos. Trabajar con animales presenta la ventaja de que se pueden administrar dosis altas de un compuesto aislado y hacer un seguimiento.

2. 6. 1. El Proceso LADME de los Compuestos Fenólicos

Los estudios de farmacocinética diferencian varias etapas en el seguimiento de un principio activo en el organismo, que son liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción. Estas cinco etapas se citan como el proceso LADME.

a) Liberación

Para que una sustancia pueda ser absorbida debe encontrarse en disolución. En frutas y verduras, los compuestos fenólicos se encuentran de forma natural en formas glucosídicas o perteneciendo a grandes estructuras poliméricas, lo que hace suponer que para su absorción se necesita una hidrólisis previa. La ventaja del vino en relación a otros alimentos, es que la fermentación alcohólica produce una ruptura parcial o total de dichas estructuras, y los compuestos fenólicos se encuentran libres y estables en una solución coloidal (*Goldberg, 1995*).

b) Absorción

Cualquier desplazamiento de un compuesto dentro del organismo, exige su paso a través de las membranas biológicas. Esto incluye tanto los mecanismos de absorción como los de distribución y eliminación y depende de las características fisicoquímicas de la propia molécula. Las moléculas pequeñas, que suele ser el caso de los fármacos, atraviesan la membrana por difusión pasiva, difusión facilitada o por transporte activo.

La absorción se produce en la mucosa del estómago e intestino delgado de acuerdo con las características fisicoquímicas del fármaco y las peculiaridades de la mucosa. Se siguen en general las leyes de la difusión pasiva, aunque en algunos casos podría haber transporte activo.

Como la forma no ionizada es la que se absorbe de manera preferente, los ácidos débiles lo harán en el estómago y las bases débiles en el intestino. Las formas ionizadas no se absorben o lo hacen en pequeño grado.

Facilita igualmente la absorción la capacidad de resistencia al pH, a las enzimas digestivas y a las enzimas metabólicas presentes en las células de la mucosa o en la luz intestinal (ej. las bacterias). La ionización completa del fármaco, como puede ocurrir por modificaciones del pH, impide claramente la absorción (*Flores et al., 1992*).

La velocidad de paso a través de membrana de una molécula está directamente relacionado con su liposolubilidad (o menor polaridad) y de forma inversa con su tamaño. Las moléculas polares sin carga eléctrica y si son pequeñas, también difunden con rapidez; mientras que las moléculas ionizadas no atraviesan la membrana por pequeñas que sean (*Flores et al., 1992*).

El comportamiento de los flavonoides en el tracto digestivo todavía resulta confuso. En un principio se pensó que la glucosidación de los fenoles dificultaría su absorción. Se creía que los glucósidos de flavonoides deberían ser hidrolizados antes de ser absorbidos (*Kuhnau, 1976*). La solubilidad de una sustancia en las micelas de los ácidos biliares es importante para su absorción intestinal. Al aumentar la hidrofilia se disminuye la solubilidad en micelas y por ello su absorción. Sin embargo, la actividad beta-glucosidasa de la microflora va a producir la hidrólisis de los glucósidos, quedando la forma aglicona en el intestino grueso (*Tamura et al., 1980*). Ciertas enterobacterias, como *Bacteroides distasonis B*, *uniform B*, y *ovatus* parecen ser las responsables de dicha actividad beta-glucosidasa (*Bokkenheuser et al., 1987*). Además, las enterobacterias pueden provocar la escisión del anillo de una parte de las agliconas. Con cada paso en la escisión aumenta la lipofilia del compuesto resultante, siendo estos altamente soluble en las micelas de los ácidos biliares.

Estas teorías concuerdan con resultados obtenidos en estudios con ratas, en los que se ha comprobado que la absorción de la rutina era más lenta que la de su forma libre y que la de la quercetina (*Manach et al., 1996*). La explicación que se dio a este hecho fue que sólo la quercetina se absorbe en el intestino delgado, mientras que la rutina tiene que ser hidrolizada por la microflora antes de ser absorbida, y esto ocurriría en el intestino grueso. Por tanto la conclusión a la que llegan estos autores es que las formas libres serían más disponibles que las gluco-

sidadas, pudiendo ser absorbidas en intestino delgado y grueso (*Manach et al., 1996*).

Sin embargo, la absorción de glucósidos de quercetina parece posible en el intestino delgado de sujetos ileostomizados sanos, tras el consumo de cebollas. Incluso los resultados indican que la absorción de los glucósidos de la quercetina más fácil que la de quercetina libre (*Hollman et al., 1995*). Pero otros autores atribuyen este hecho a una modificación del tracto digestivo de estos pacientes (con una localización diferente de la flora colónica) o a los componentes de la matriz (*Manach et al., 1997*).

Los flavonoles glucosidados pueden ser absorbidos como tales, y la presencia de la glucosa favorece la absorción. La absorción de los flavonoles es bastante rápida, de media a cuatro horas y son excretados con tiempos de vida media de una a seis horas (*Hollman y Arts, 2000*). Otros científicos han demostrado la absorción en el intestino humano de glucósidos de flavonoides, en particular de los glucósidos de quercetina phloridzin y rutina (*Paganga y Rice-Evans, 1997*).

Otros autores demuestran que el plasma de sujetos humanos no suplementados presenta rutina (glucósido de quercetina) a concentración 0.74 μM , y describen un método que permite la determinación en plasma humano de flavonoides de tipo glucósidos de flavonoles, flavonas y otros flavonoides (*Paganga y Rice-Evans, 1997*). En este estudio realizado por cromatografía líquida con detector de fotodiodos, se consiguen unos límites de detección (LDD) del orden de 400 a 600 nM en plasma.

En estudios más recientes se comprueba que, de forma contraria a lo que se pensaba en un principio, la glucosidación no dificulta la absorción e incluso podría favorecerla. Así, tras una ingesta de cebollas, los glucósidos de quercetina son absorbidos de forma más rápida que la quercetina libre (*Hollman y Katan 1997*). Se ha llegado a plantear que los glucósidos de quercetina podrían interactuar con el receptor de los transportadores de glucosa dependientes de sodio del epitelio de la mucosa intestinal, favoreciéndose de esta manera su absorción a este nivel (*Gee et al., 1998*). Lo cual se podría hacer extensivo al resto de compuestos fenólicos glucosidados.

c) Distribución

Los estudios farmacocinéticos han establecido que, en general, una vez producida la absorción los compuestos polares son transportados por la circulación sanguínea unidos a proteínas plasmáticas. La albúmina es la proteína con mayor poder de fijación y transporta casi todas las sustancias de carácter ácido. Tras la absorción, el fármaco se encuentra en un equilibrio entre la fracción unida a proteínas plasmáticas y la que está disuelta en plasma, y así se define una constante de asociación (*Flores et al., 1992*), que se expresa como:

$$K = \frac{[FP]}{[F][\text{sitios libres}]}$$

donde FP = fármaco unido y F = fármaco libre

Los principales tipos de proteínas presentes en el plasma son albúmina, globulina y fibrinógeno. La principal función de la albúmina es proporcionar la presión coloidosmótica en el plasma para evitar la pérdida de sangre de los capilares. Las globulinas tienen distintas funciones enzimáticas y son responsables de la inmunidad, tanto natural como adquirida frente a microorganismos. El fibrinógeno interviene en el proceso de coagulación (*Guyton y Hall, 1997*).

En sangre los distintos fármacos son transportados unidos a proteínas como la albúmina, especialmente los de carácter ácido, como el ácido salicílico (*Flores et al., 1992*).

Los flavonoides absorbidos del tracto intestinal, se unen a moléculas de albúmina y son transportados hasta el hígado a través de los conductos linfáticos o de la vena porta. Parece ser que son el hígado y la flora colónica los principales lugares de metabolismo de los flavonoides y existe evidencia de la o-metilación, sulfonación y conjugación con glucuronidos de los grupos hidroxilos en el hígado. Se ha encontrado que en el plasma de ratas había conjugados de quercetina e isorhamnetina complejados con albúmina (*Terao, 1999*).

Diversos estudios demuestran cómo los polifenoles del vino tinto se adsorben a la superficie de las lipoproteínas después de su paso a través de la pared intestinal, y que son, al menos en parte, transportados asociados a las LDL. La

unión entre ambos se da en la interfase aceite/agua, y no en el núcleo lipídico de la partícula de LDL, de acuerdo con el carácter esencialmente hidrosoluble de los fenoles, por lo que se pueden separar por simple diálisis o por cromatografía líquida de gel filtración (*Carbonneau et al., 1997; 1998*). Al comparar la afinidad de diferentes compuestos fenólicos, como ácido cafeico, ácido sinápico; ácido gálico y catequina por las LDL, se pudo comprobar que el ácido gálico es el que se encuentra más fuertemente asociado a las LDL, hecho que podría tener consecuencias fisiológicas particulares en términos de transporte a los tejidos extrahepáticos (*Cartron et al., 2001*).

d) Metabolismo

Cuando los principios activos penetran en el organismo, la mayoría de ellos son transformados total o parcialmente en otras sustancias. Las enzimas responsables de estas transformaciones se encuentran principalmente en el hígado, pero también están presentes en: riñón, pulmón, intestino, en la propia luz intestinal (flora bacteriana) y glándulas suprarrenales. Una misma molécula puede ser biotransformada a la vez en varios lugares y sufrir diversas transformaciones en sucesivos pasos a través del hígado, por lo que puede originar numerosos metabolitos que serán activos o inactivos según cada caso en particular. Las múltiples reacciones que ocurren se agrupan para su estudio en dos grupos: reacciones de fase I y reacciones de fase II.

Las reacciones de fase I o de funcionalización son de tres tipos: oxidación, reducción e hidrólisis. Estas reacciones introducen nuevos grupos funcionales en la molécula, como grupos $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$ y $-\text{OH}$ que en la mayoría de los casos implican un aumento de la polaridad y permiten posteriores reacciones.

Las reacciones de oxidación y reducción tienen lugar en la fracción microsomal del hígado y otros tejidos. También, aunque en menor grado, puede haber oxidación en las mitocondrias.

En las reacciones de hidrólisis intervienen enzimas hidrolasas, que están ampliamente distribuidas en plasma y tejidos, y según la naturaleza del enlace que hidrolizan se dividen en: esterasas, amidasas, glucosidasas y peptidasas.

Las reacciones de fase II son reacciones de conjugación, en las que el metabolito de la fase I se acopla a un sustrato endógeno tal como ácido glucuróni-

co, ácido acético o el ácido sulfúrico. Se aumenta así el tamaño de la molécula, resultando productos polares, ácidos y bases fuertes, e hidrosolubles, con lo cual se facilita su excreción por orina y bilis. Tienen lugar en hígado y otros tejidos y son debidas a enzimas denominadas transferasas. Las principales reacciones son: glucuronidación, acilación, metilación y conjugaciones con glutation, radicales sulfato, ribósidos y ribósido-fosfatos.

Veamos de estas reacciones las principales para los grupos fenólicos (*Flores et al., 1992*):

Glucuronidación

Es una de las vías más importantes en la eliminación de fármacos del organismo. El ácido glucurónico se combina con fenoles y produce un glucurónido hemiacetalico. Esto ocurre en la fracción soluble del hígado, donde hay enzimas que catalizan la síntesis del ácido uridinfosfato glucurónico (UDPGA) a partir de la glucosa. Dicho ácido actúa como donador del ácido glucurónico, proceso que cataliza una enzima presente en los microsomas hepáticos: la UDP-glucuroniltransferasa (UDPGT).



Puede ocurrir sobre moléculas que contengan grupos -OH, -NH₂, -COOH y -SH. En general, los glucurónidos son más solubles en agua que el compuesto del que proceden, por lo que su excreción por orina y bilis resulta más fácil.

Acilación de ácidos carboxílicos

Consiste en la incorporación de un radical acilo (a menudo acetilo) a un grupo carboxilo gracias a la aciltransferasa y a derivados de la coenzima A (CoA-SH).



Conjugación con radicales sulfato

Es una vía importante de biotransformación de grupos fenólicos y de grupos hidroxilos alifáticos. Ocurre en el hígado y se necesita una activación previa del SO₄²⁻ y la intervención de las enzimas sulfotransferasas.



donde FAFS = 3'-fosfoadenosil-5'-fosfosulfato

Metilación

Consiste en la adición de radicales metilo gracias a las enzimas metiltransferasas que se encuentran en muchos tejidos: hígado, suprarrenales, cerebro, etc. En el caso de los fenoles se produce una O-metilación gracias a la enzima O-metiltransferasa.

d.1.) Transformación metabólica y circulación enterohepática

El primer paso del metabolismo es la ruptura del enlace glucosídico, sea en el intestino previa a la absorción, dentro del enterocito por una enzima citosólica beta-glucosidasa o por las bacterias de la microflora (*Williamson et al., 2000*).

Flavonoles y flavanoles son metabolizados principalmente en hígado y colon. Las transformaciones hepáticas suponen glucuronidación y sulfatación de los grupos OH fenólicos y O-metilación de los catecoles (*Hollman y Arts, 2000*).

En general se piensa que el hígado es el principal órgano para el metabolismo de los flavonoides. Sin embargo, la mucosa intestinal, riñones y otros tejidos, también poseen actividad enzimática para biotransformar los flavonoides, como: UDP-glucuroniltransferasa, O-metiltransferasa, e hidroxilaciones caso del citocromo P450 (*Hackett y Griffiths, 1983*). En este sentido se han estudiado diferentes actividades (fenosulfotransferasa, UDP-glucuroniltransferasa y catecol-O-metiltransferasa) de hígado, riñones, pulmón y mucosa intestinal (*Piskula y Terao, 1998a*). El tejido que presentó mayor actividad UDP-glucuroniltransferasa fue la mucosa intestinal, tanto la del intestino delgado como la del grueso. Por otro lado fue el hígado el que presentó mayores actividades de fenosulfotransferasa y catecol-O-metiltransferasa. Como consecuencia de este estudio se concluye que el primer paso en la conversión metabólica de los flavonoides de la dieta es la glucuronidación en la mucosa intestinal.

Los flavonoides entran en la vena porta exclusivamente en forma de conjugados con glucurónico. Inmediatamente después, siguiendo sulfatación en el hígado y metilación en hígado y riñones, los metabolitos son excretados del cuerpo vía biliar o urinaria. Este esquema se basa en el hecho de que en el plasma de

rata, después de la administración de (-)-epicatequina, se acumulan glucuronidos de (-)-epicatequina y después aparecen productos metilados o sulfatados.

Además, en el tubo digestivo, las enterobacterias pueden provocar la escisión del anillo de una parte de las agliconas. Así, en el caso de la quercetina se han identificado los siguientes compuestos como productos de la escisión de su anillo: ácido 3,4-dihidroxifenilacético, ácido homovainílico y ácido hidroxifenilacético (*Booth et al., 1956*).

Los flavonoles y las catequinas son en gran parte convertidos a glucuronil derivados en la mucosa intestinal. Estos derivados pasan al hígado, donde tienen lugar otras transformaciones, como metilación, sulfatación, y conjugaciones diversas con ácido glucurónico, sulfato y glicina (*Hackett, 1986*).

Tras la ingestión de vino tinto, se realiza el seguimiento de la (+)-catequina en plasma y se constata que aparece mayoritariamente en forma de metabolitos sulfatados, metilados y conjugados con glucurónico, siendo la forma libre un 2% de estos metabolitos. También se confirma que el metilado mayoritario es la 3'-O-metilcatequina (*Donovan et al., 1999a*).

Después de la administración de (-)-epicatequina a ratas, pudieron detectarse tres compuestos en plasma y orina, pero no en bilis, que resultaron ser: (-)-epicatequina, 3'-O-metil(-)-epicatequina y 4'-O-metil(-)-epicatequina. También se identificaron dos formas conjugadas con glucurónico: (-)-epicatequina-5-O-beta-glucurónido y 3'-O-metil(-)-epicatequina-5-O-beta-glucurónido, que resultaron ser los metabolitos predominantes, tanto en plasma como en orina. La suma total de los metabolitos excretados en orina durante 24 horas se corresponde con un 8% de la dosis administrada de (-)-epicatequina (*Okushio et al., 1999*).

Estos resultados concuerdan con los de otro estudio, donde se describe que después de la administración oral a ratas de (+)-catequina y (-)-epicatequina se identificaron dos compuestos como metabolitos mayoritarios presentes en plasma, bilis y orina, que fueron: (+)-catequina-5-O-beta-glucurónido y (-)-epicatequina-5-O-beta-glucurónido. Ambos también demostraron alta actividad antioxidante como atrapadores de radicales anión superóxido, por lo que deben ser activos in vivo (*Harada et al., 1999*).

d.2.) Metabolitos presentes en plasma

Como ya se ha explicado, la actividad antioxidante está en parte asociada con el número de grupos hidroxilos y su relación estructural en la molécula. Resulta probable que al menos parte de esta capacidad antioxidante se pierda con las conjugaciones metabólicas. La capacidad antioxidante de los flavonoides se ha puesto de manifiesto en experimentos *in vitro*. Sin embargo, a causa de sus rápidas y efectivas alteraciones metabólicas, resulta difícil demostrar dicha capacidad en sistemas *in vivo* (Terao, 1999).

La capacidad que tienen todos los flavonoides de atrapar radicales libres está relacionada principalmente con sus hidrógenos fenólicos. Resulta complicado saber si los flavonoides conservan alguna propiedad antioxidante después de la absorción intestinal y de su conversión metabólica. Se ha comprobado que la administración oral de epicatequina a ratas mejora la resistencia a la oxidación del plasma (Edson *et al.*, 1998). En este estudio los niveles plasmáticos de epicatequina no metabolizada eran demasiado bajos o no detectables para explicar directamente el efecto observado. Es probable que sean los metabolitos de epicatequina los responsables, como conjugados con la estructura o-hidroxilo (Terao, 1999).

Para estudiar los posibles metabolitos de los flavonoides, se diseñó un experimento que los somete a una incubación en microsomas de rata *in vitro* (Dragsted *et al.*, 1997). El resultado de dicho estudio es que hay flavonoides que no sufren ninguna alteración después de la incubación microsomal, y estos son: quercetina, miricetina y luteolina. Sin embargo, otros sí que quedan modificados por hidroxilación o desmetilación, dando como resultado la correspondiente forma catecol que es el producto final en todos los casos. Algunos casos observados son:

kaempferol + OH⁻ → quercetina

tamarixetina (4'-O-methylated quercetina) - CH₃ → quercetina

d.3.) Conjugación con sulfato y glucurónido

Los niveles de catequina y 3'-metilcatequina en plasma, fueron extremadamente bajos y cercanos al límite de detección, 1-2 nmol/l. Al transcurrir una hora desde la ingesta, la catequina libre suponía un 2% de los metabolitos sin metilar, y pasadas 3-4 horas no se detectó catequina libre en plasma. Los niveles de 3'-metilcatequina a la hora eran de un 7% de los metabolitos sin metilar, y de un

5% a las 3-4 horas. En total las formas libres de catequina y 3'-metilcatequina no sumaron más de un 2% de los niveles de catequina total en plasma. En ningún momento se detectaron conjugados sulfatados de los metabolitos metilados. Los metabolitos sulfatados de las formas libres presentaron un nivel máximo pasada una hora desde la ingestión, de 7 a 28 nmol/L, pero estos metabolitos tienen una vida media relativamente corta ya que se eliminan de forma rápida (*Donovan et al., 1999a*).

Se ha administrado (-)-epicatequina a ratas, y una hora después se han detectado en plasma glucurónidos, o-metilglucurónido sulfatos y glucurónido sulfatos de epicatequina. Los conjugados con glucurónido fueron las formas predominantes, mientras que la epicatequina libre era de un 7 a un 13% de la cantidad total absorbida, según la ingesta (10 o 50 mg respectivamente) (*Da Silva et al., 1998*).

e) Excreción

La excreción renal es la vía más importante de excreción de fármacos. La eliminación por orina se realiza a favor de los mecanismos de formación de la misma:

- I. Filtración glomerular: el capilar posee abundante poros que permiten el paso de casi todas las moléculas, exceptuando las que se encuentran fijadas a proteínas plasmáticas.
- II. Secreción tubular: desde la arteriola aferente hacia la luz del túbulo renal a través de dos mecanismos: difusión pasiva y transporte activo (selectivo sólo para algunos fármacos).
- III. Reabsorción tubular: también por difusión pasiva o transporte activo. Depende del pH de la orina. En la orina alcalina se ionizarán los fármacos no metabolizados de carácter ácido: AAS, salicilatos, fenobarbital...y en la orina ácida se ionizarán más los de carácter alcalino.

El resultado de todos estos procesos es la excreción urinaria que se cuantifica mediante el parámetro denominado *aclaramiento renal*, que mide el flujo hipotético de plasma que debe circular por el riñón para que, a una determinada concentración plasmática de una sustancia, pueda desprenderse de la cantidad de la misma que se recoge en la orina:

$$\text{CIR} = (\text{Cu} \times \text{Vu}) / \text{Cp}$$

CIR = aclaramiento renal; Cu = concentración urinaria; Vu = volumen de orina eliminado por unidad de tiempo; Cp = concentración plasmática.

La acidez de la orina influye en la eliminación de las sustancias, y se ha establecido una relación entre las concentraciones urinaria y plasmática para un compuesto dado, deducida de la ecuación de Henderson-Hasselbach:

Para compuestos ácidos:

$$\text{Cu} / \text{Cp} = [1 + 10^{\text{pHu} - \text{pKa}}] / [1 + 10^{\text{pHp} - \text{pKa}}]$$

Para compuestos básicos:

$$\text{Cu} / \text{Cp} = [1 + 10^{\text{pKa} - \text{pHu}}] / [1 + 10^{\text{pKa} - \text{pHp}}]$$

En 1971, *Das y colaboradores* comprobaron que la (+)-catequina era absorbida en el tracto gastrointestinal tras administrar una dosis oral de 4.2 g (una cápsula de gelatina en el desayuno) a voluntarios sanos. Se observó que la (+)-catequina era excretada en orina junto con varios metabolitos no identificados, siendo la cantidad excretada en 24 horas un 7.5% aproximadamente de la dosis ingerida. La (+)-catequina sin cambios fue detectada en las heces recogidas durante 48 horas, en un porcentaje del 19% de la dosis inicial.

Algunos investigadores han estudiado la excreción urinaria de compuestos fenólicos administrados oralmente como una medida de la absorción de los mismos y han mostrado la presencia de algunos fenoles en orina, como los ácidos cafeico, cumárico y ferúlico y el flavonoide rutina (*Bourne y Rice-Evans, 1999*).

Otros autores desarrollaron un método para analizar antocianos en la orina tras la ingesta de vino tinto. El estudio se realiza con voluntarios humanos a los que se administra vino tinto y antocianinas puras. Mediante cromatografía líquida y detector de fotodiodos llegan a identificar varios compuestos que presentaban espectros muy similares a las antocianinas (*Lapidot et al., 1998*).

La quercetina se ha podido detectar sin cambio en heces en una cantidad de un 53% de una dosis de 4g administrada por vía oral (*Gugler et al., 1975*).

En otro estudio se plantea la detección de flavonoides en orina a partir del consumo de brócoles. Los flavonoides a los que se realizó el seguimiento fueron: quercetina, miricetina y kaempferol. De ellos, el kaempferol pudo ser detectado sin cambios en la orina y también la quercetina, aunque con mayor dificultad en niveles de tan sólo un $\pm 0.4\%$ respecto a la dosis ingerida (*Dragsted et al., 1997*).

2. 6. 1. Determinación de Compuestos Fenólicos en Plasma

La determinación de compuestos fenólicos en plasma encuentra una serie de dificultades inherentes a la propia naturaleza compleja de la matriz. Por una parte, existen compuestos que pueden interferir en la medida, como proteínas, lipoproteínas, aminoácidos, enzimas, sistemas tampón, etc. También hay que considerar posibles conversiones metabólicas, ya que, aún *in vitro* ciertas enzimas plasmáticas tienen actividad. Además, los fenoles que en el vino se encuentran en concentraciones de mg/L sufren una gran dilución al llegar al plasma aún cuando sean absorbidos en su totalidad, por lo que es de esperar que las concentraciones de estos compuestos en plasma sean muy bajas y se necesita un método que sea suficientemente sensible para cuantificarlas.

En la bibliografía disponible sobre análisis de fenoles en muestras biológicas se advierte que es fundamental controlar la temperatura. Así, se ha descrito la importancia de trabajar con la muestra siempre en frío porque se constata una pérdida de catequina notable en plasma humano (sólo permanece un 8% de la concentración inicial en 24 horas) cuando se trabaja a temperatura ambiente. Cuando la muestra se mantiene a 0°C durante 24 horas se recupera un 85% de la cantidad inicial, y si la temperatura es de -20°C no hay pérdida apreciable de catequina en el mismo período de tiempo (*Carando et al., 1998*). Resultados similares se obtienen en la determinación de catequina en plasma de conejo en función de la temperatura y el tiempo y, además, se encuentra que la catequina es estable en un intervalo de pH de 2.0 a 5.0, pero a partir de 5 y cuanto mayor sea la basicidad se observan mayores pérdidas (*Ho et al., 1995*).

Es bien conocido que los compuestos fenólicos tienden a reaccionar con las proteínas, siendo por ello los taninos responsables de los efectos astringentes del vino (*Cheyrier et al., 1997*). Se ha descrito la afinidad de los fenoles por el aminoácido prolina (*de la Torre Boronat, 1998*) y en concreto la afinidad de la quercetina por la albúmina (*Manach et al., 1995*). También, en recientes publicaciones se detectan compuestos fenólicos unidos a las LDL plasmáticas, como la

rutina y otros compuestos no identificados con espectros de absorción UV similares a los flavonoides (*Lamuella-Raventós et al., 1999*).

Se han llevado a cabo ensayos en humanos en los que se administra una dosis de un único compuesto polifenólico a un voluntario y después se intenta detectar éste o algún posible metabolito en plasma. Así, Estudios realizados en ratas y humanos alimentados con flavonoles (de vegetales y preparados farmacéuticos) y catequinas (de té verde) han confirmado que estos compuestos son absorbidos parcialmente en el intestino (*Pietta y Simonetti, 1999*). Si bien existen pocos ensayos acerca de la presencia en plasma humano de compuestos fenólicos después de una comida, el compuesto más estudiado ha sido la catequina.

En otro estudio se determinan los niveles de catequina y sus metabolitos en plasma después de la ingestión de vino tinto (*Donovan et al., 1999a*). Los niveles de catequina sin modificar en plasma fueron extremadamente bajos y cercanos al límite de detección, 1-2 nmol/L. A la hora de la ingesta, la catequina libre era un 2% de los metabolitos sin metilar, y a las 3-4 horas no se detectó catequina libre en plasma.

También se ha detectado la presencia en plasma de ratas de resveratrol, que tras alimentarlas con dosis de 2 mg de resveratrol por kg de peso presentaron niveles plasmáticos de 0.175 mg resveratrol/L plasma (*Juan et al., 1999*). Asimismo se ha demostrado la absorción del resveratrol *in vivo* en ratas a las que se había administrado vino tinto. Tanto el trans- como el cis-resveratrol son absorbidos ya que se encontraron en corazón, hígado y riñones (*Bertelli et al., 1996b*).

Tras la administración de una dosis oral de 4 g de este flavonol, no se pudo detectar en plasma ni en orina (*Gugler et al., 1975*). Más recientemente, la quercetina libre no se pudo detectar en el plasma de sujetos alimentados con una dieta rica en vegetales que contenía una cantidad estimada de 87 mg de quercetina (*Manach et al., 1998*), aunque se pudo ver un aumento significativo de sus formas conjugadas, restableciéndose los niveles basales a las 20 horas.

La explicación a las diferencias observadas puede justificarse en base a la solubilidad de la quercetina, en la que puede influir el vehículo usado para su administración limitando su absorción, tal como se ha demostrado en ratas (*Piskula y Terao, 1998b*).

Se han propuesto distintos procedimientos de tratamiento de muestra de plasma para la determinación de compuestos fenólicos. Los métodos más comunes incluyen la extracción líquido-líquido, la extracción en fase sólida y la desproteinización y, en general, se aplican al análisis de cada sustancia individualmente.

En el caso de la extracción líquido-líquido se han empleado diversos disolventes. Para detectar quercetina e isorhamnetina, un tratamiento descrito consiste en añadir a una alícuota de plasma, una disolución tampón de acetato sódico ajustando el pH a 5.0 y añadiendo metanol/ ácido acético. Mediante CLAE y detección electroquímica pueden detectarse ambos compuestos siempre que se realice una hidrólisis previa con sulfatasa/ β -glucuronidasa (Piskula y Terao, 1998b).

Se han empleado otros disolventes, como acetato de etilo, para detectar la presencia de trans-resveratrol en plasma de ratas (Zhu et al., 1999) y en la determinación de compuestos relacionados con la catequina tanto en plasma como en orina en humanos (Lee et al., 1995; Yang et al., 1998).

También se ha propuesto el uso de acetonitrilo para extraer la catequina (Carando et al., 1998), así como metanol (Paganga y Rice-Evans, 1997) y metanol acidificado (Manach et al., 1995) para la determinación de flavonoides en plasma. Todos estos reactivos, además de extraer el compuestos fenólico en cuestión, producen una desproteinización en mayor o menor grado. El procedimiento consiste en la adición del disolvente seguido de centrifugación, evaporación a sequedad en rotavapor y reconstitución con un volumen conocido.

La desproteinización más energética se lleva a cabo con ácido trifluoroacético, método tradicional empleado en análisis clínico. Este reactivo se ha aplicado a la determinación de metabolitos de catequina y epicatequina en plasma (Harada et al., 1999).

La extracción en fase sólida es un tratamiento menos utilizado pero que ofreció buenos resultados en la determinación de resveratrol (Juan et al, 1999) y de hidroxitirosol (Ruiz-Gutiérrez et al., 2000) en plasma de ratas.

Con el objetivo de liberar los principales derivados metabólicos de los compuestos fenólicos, que son las formas conjugadas con sulfato y glucurónico, se puede realizar una incubación de la muestra con enzimas β -glucuronidasas y

sulfatasas (Morand et al., 1998; Donovan et al., 1999a; Andlauer et al., 2000; Baba et al., 2000). En un reciente trabajo se combina la actividad b-glucuronidasa con una hidrólisis ácida para la determinación de quercetina e isorahmnetina (Morrice et al., 2000). Tras la hidrólisis enzimática, se puede comprobar que la presencia del fenol libre en comparación con estos conjugados suele ser mínima tanto en plasma (Donovan et al., 1999a) como en orina (Virgili et al., 2000).

Se ha propuesto el empleo de un detector de fluorescencia acoplado a un cromatógrafo líquido para determinar catequina en plasma humano (Carando et al., 1998). Los niveles de catequina encontrados en el plasma de cinco voluntarios, en dicho ensayo, oscilaron entre 0.268 y 0.809 mg/L de plasma 12 horas después de una comida rica en frutas, verduras y 300 mL vino tinto. El límite de detección fue de 5 ng/mL para el detector de fluorescencia. Recientemente, el mismo grupo empleando una metodología similar ha llevado a cabo un exhaustivo estudio con 180 voluntarios para investigar el aporte de catequina a partir de cuatro dietas distintas. Los resultados obtenidos mostraron que los niveles de catequina en plasma eran más altos cuando en la dieta se incluían junto al vino tinto verduras y frutas (Ruidavets et al., 2000).

La mayoría de los flavonoides no son fluorescentes, pero se puede conseguir que emitan fluorescencia si son quelados con aluminio, resultando compuestos que sí fluorescen. Este procedimiento consigue un límite de detección de 0.005 mg/L para la quercetina en plasma humano. El método es válido para los flavonoles, que son los que forman el complejo con Al^{3+} ; no obstante, tiene una serie de inconvenientes, como la posibilidad de alterar la naturaleza de los fenoles con los tratamientos necesarios para la quelación o que esta no sea completa. Mediante el procedimiento empleado por los autores se hidrolizan los glucósidos con HCl 2M detectándose tan sólo la aglucona en las muestras de plasma. Los niveles de quercetina total (incluyendo metabolitos y glucósidos) tras la ingesta de cebollas fritas en dos voluntarios humanos, alcanzaron un máximo de 0.6 μ M en plasma (0.196 mg/L de quercetina) a las 2.9 horas de la ingesta (Hollman et al., 1996).

2. 6. 2. Determinación de Compuestos Fenólicos en Orina

Para estudiar la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos se hace necesario completar las distintas etapas del proceso farmacocinético, absorción, distribución, metabolismo y eliminación. Estos dos últimos términos se engloban

bajo el nombre común de excreción, y se concreta comúnmente en la determinación de compuestos en la orina (Flores, 1992).

El procedimiento de extracción líquido-líquido es el más frecuente en muestras de orina. Se ha descrito una doble extracción con acetato de etilo para la determinación tanto en plasma como en orina de catequina, epicatequina y sus metabolitos (Lee et al., 1995; Yang et al., 1998).

Bourne y Rice-Evans (1999) realizan una extracción líquido-líquido con metanol para determinar el ácido ferúlico en orina y compuestos fenólicos en plasma (Paganga y Rice-Evans, 1997).

A la hora de estudiar la presencia de un compuesto fenólico en orina interesan además otras cuestiones, como el porcentaje de dosis excretada, la presencia de derivados conjugados con sulfato o glucurónico y el tiempo al que se produce la excreción máxima.

El compuesto fenólico más comúnmente detectado en orina hasta la fecha es el ácido ferúlico. Así, tras la ingesta de tomates en una cantidad estimada para aportar unos 21-44 mg de ácido ferúlico, las cantidades excretadas a lo largo de 24 horas fueron de 0.363 a 0.532 mg/L, siendo la excreción máxima en el minuto 425. La cantidad medida en orina supone un 4-5% de la dosis ingerida. Junto con el ferúlico se extraen los demás hidroxycinamatos e incluso otros compuestos más polares como los ácidos benzoicos y la rutina. Sin embargo, ninguno de estos compuestos fue cuantificado (Bourne y Rice-Evans, 1999).

De la cantidad total de ácido ferúlico que se excreta en orina, de un 2 a un 20% corresponde a productos de conjugación con sulfato o glucurónico. Las variaciones se deben a diferencias interindividuales (Virgili et al., 2000).

También se ha registrado la presencia de ácido ferúlico en orina tras el consumo de cerveza sin alcohol, alcanzándose los niveles más altos de eliminación alrededor de las 8 horas desde la ingesta, y siendo la concentración medida de 5.8 ± 3.2 mg/L (Bourne et al., 2000).

Se han podido detectar diversos hidroxycinamatos (ácidos ferúlico, clorogénico y cafeico) en plasma y orina tras un ensayo con voluntarios humanos que consumían ciruelas. Los tratamientos de las muestras incluían hidrólisis y extrac-

ción líquido-líquido con acetato de etilo. La detección se llevó a cabo mediante espectrómetro de masas acoplado al cromatógrafo líquido (*Cremin et al., 2001*).

La catequina y la epicatequina no pudieron ser detectadas en muestras de orina tras su administración oral a ratas. Sin embargo, sí se pudieron detectar sus correspondientes metabolitos conjugados con ácido glucurónico. Las cantidades determinadas suponían alrededor de un 8% de la dosis administrada para los metabolitos de epicatequina y algo inferiores, de un 4.74 % a un 6.97 %, para los de catequina (*Harada et al., 1999*).

La extracción en fase sólida con cartuchos C18, junto con una hidrólisis enzimática, se ha aplicado a la determinación de kaempferol, quercetina y miricetina en orina tras la ingesta de brócoles. En este estudio el kaempferol se detecta sin transformaciones en orina. La quercetina aparece en un 0.4% de la dosis ingerida, pero se apunta que este compuesto también puede ser un producto del metabolismo del kaempferol y de la tamarixetina (*Dragsted et al., 1997*).

Para la determinación de quercetina, kaempferol y sus conjugados en plasma o en orina se realiza una extracción con metanol acidificado con HCl y se analiza con HPLC acoplado a un detector de fluorescencia (*Hollman et al., 1997; de Vries et al., 1998*).

En cuanto a la determinación de antocianos en orina podemos señalar que aunque se han realizado diversos intentos (*Lapidot et al., 1998*), los resultados no son concluyentes hasta el momento.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Del estudio de la bibliografía consultada se puede concluir que la investigación acerca de la influencia del consumo de vino en la salud abarca muy diversos campos y se puede enfocar desde puntos de vista muy diferentes. Uno de los aspectos más interesantes supone un mayor conocimiento sobre la absorción y metabolismo de los compuestos fenólicos tras la ingesta de vino.

El planteamiento de nuestro trabajo ha sido estudiar factores directamente relacionados con la presencia en los vinos de compuestos de interés para la salud, así como su posterior utilización por el organismo humano. Los objetivos concretos que se han planteado para este trabajo de investigación son los siguientes:

1. Evaluar el contenido en resveratrol y compuestos relacionados en vinos andaluces, atendiendo tanto a factores vitícolas como los enológicos propios de la zona.

2. Conocer en qué medida los procesos digestivos gástrico e intestinal pueden modificar la composición fenólica inicial.

3. Disponer de métodos analíticos adecuados para la correcta identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos habituales del vino así como de sus metabolitos en fluidos biológicos, contemplando aspectos como:

- a) La complejidad de la matriz (plasma, orina) y sus posibles interacciones con los analitos.
- b) Las condiciones para la correcta manipulación de las muestras biológicas de plasma y orina en orden a posterior análisis.
- c) La detección a unos niveles adecuados a las bajas concentraciones que cabe esperar tras una ingesta dietética.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. 1. MUESTRAS

4. 1. 1. Muestras de Vinos y Mostos

Para nuestro estudio se han seleccionado diferentes tipos de vinos elaborados en zonas de Andalucía, unas de gran tradición vinícola, como son: Jerez de la Frontera y Sanlúcar de Barrameda, el Condado de Huelva, Montilla-Moriles y el Aljarafe sevillano, además de otras zonas cuya producción es menor y su comercialización data de tiempos más recientes, como Bailén (Jaén) y Campocámara (Granada).

Los vinos característicos y genuinos de Andalucía son los vinos generosos, dentro de los cuales se diferencian tres grandes grupos: finos y manzanillas, amontillados y olorosos.

Esta clasificación atiende al tipo de crianza seguida en su elaboración, la cual puede ser biológica u oxidativa. La crianza biológica es un proceso característico de las denominaciones de origen andaluzas. Acabada la fermentación del mosto, el que se va a destinar a la elaboración de vino fino se encabeza con alcohol vínico hasta 15'5°. Entonces aparece de forma espontánea un velo de flor que cubre la superficie y aísla el vino del contacto con el aire, evitando así su oxidación. Este velo es el resultado del desarrollo de unas levaduras, todas ellas del género *Saccharomyces*. Los vinos generosos se elaboran mediante un sistema dinámico de criaderas y solera, en el que cada año ingresa en la escala más joven el vino del año llamado sobretabla, donde se va a mezclar con el vino de años anteriores. Este sistema lo que persigue es una homogeneización de los vinos obtenidos a lo largo de los años, para conseguir todos los años un vino de características constantes. Esta es la razón por la que en los vinos generosos no existe el concepto de añada.

Los finos y manzanillas requieren para su elaboración permanecer en el sistema de criaderas y solera durante un mínimo de tres años, tal como establece el Consejo Regulador de la D.O. de Jerez y Manzanilla de Sanlúcar.

Los olorosos se elaboran a partir de un mosto que ha sido encabezado con alcohol vínico hasta 17°, por lo que el desarrollo de velo de flor no tiene lugar, su crianza se desarrolla en contacto directo con el aire; se llama oxidativa o físico-química y dura al menos siete años.

Los amontillados tienen una crianza mixta: tras una primera etapa bajo velo de flor, pasan posteriormente a una crianza oxidativa. Su proceso de crianza tiene que durar un tiempo mínimo de cinco años.

Estos vinos gozan de gran prestigio por su calidad y originalidad, y se exportan a numerosos países en todo el mundo. Sus cifras de producción son muy importantes, y han acaparado durante años casi la totalidad de la producción vinícola andaluza.

En cuanto a las variedades de uva que se cultivan en Andalucía, las más ampliamente distribuidas son blancas: Palomino y Pedro Ximénez, y en el Condado de Huelva se cultiva la variedad Zalema. Las variedades de uvas tintas cultivadas son: Tempranillo, Cabernet Sauvignon y Cencibel, entre otras.

Para la descripción de las muestras, estas se clasifican atendiendo al ensayo para el que fueron empleadas.

a) Muestras utilizadas en la determinación de resveratrol

Se han analizado un total de ochenta y una muestras, que comprenden vinos y productos vínicos en distintas fases de elaboración. El total de muestras se puede clasificar de la siguiente forma:

Productos Terminados

- 12 Finos (Tabla 5)
- 11 Olorosos (Tabla 6)
- 4 Amontillados y 2 de crianza mixta (Tabla 7)
- 14 Tintos (Tabla 8)
- 8 Blancos y 2 Mostos del Aljarafe (Tabla 9)

Productos en Distintas Fases de Elaboración

- 3 Mostos de prensa (*) de variedad Palomino, D.O. Jerez de la Frontera, campaña de 1996 (Tabla 10)
- 12 Mostos de prensa (*) de variedad Palomino, D.O. Jerez de la Frontera, campaña de 1997 (Tabla 11)
- 3 Mostos de la campaña de 1997 de tres variedades de uva: Cabernet Sauvignon, Tempranillo y Zalema (Tabla 12)
- 10 Añadas de sobretabla de vino fino de los años 1986-1995 (Tabla 13)

(*) Mosto, en la Denominación de Origen de Jerez de la Frontera, es en realidad ya un vino, pues se trata de los productos que ya han sufrido una fermentación, y que posteriormente se encabezan con alcohol vínico para obtener los distintos tipos de vinos generosos.

El grado de prensa define la cantidad y calidad del mosto resultante. En las primeras fases de la prensa se obtiene el mosto de la pulpa de la uva y, al aplicar mayor presión, el mosto va acompañado de otras sustancias procedentes del hollejo y raspón. Las bodegas, usualmente, separan los mostos de diferentes prensadas y los destinan a la elaboración de vinos de diversos tipos y calidades. A estos vinos sin crianza y que sirven como substrato para elaborar los distintos tipos de vinos generosos, (finos, amontillados y olorosos), en el marco de Jerez se les sigue llamando mostos pues consideran que el producto está inacabado. En la presente Memoria se ha respetado este término y así los mostos reseñados en este apartado tienen un grado alcohólico del orden de 12-12'5°.

La bodega que nos facilitó estas muestras establece cuatro fases en la prensa de la uva, según la presión ejercida. De esta manera, obtiene de cada 100 Kg de uva, y de menor a mayor presión:

- Los primeros 65 litros son de Mosto Yema (MY).
- Los siguientes 7 litros son media prensa ligera (MPL).
- Siguen 3 litros de media prensa mediana (MPM).
- Y, finalmente, 5 litros de Mosto Prensa (MP).

Las tres primeras fracciones se obtienen gracias a una prensa horizontal neumática. Con este tipo de prensa se consigue que el tiempo de contacto del mosto con las partes sólidas de la uva sea mínimo.

La cuarta fracción (Mosto Prensa) se consigue mediante una prensa continua convencional que alcanza las presiones máximas. El exceso de prensado de las partes sólidas de la uva, se destina a destilación, entregas o elaboración de vinagres de vino.

Productos Terminados

Muestra	Tipo de vino	Origen	Procedencia
FJ ₁	Fino	Jerez	Bodega
FJ ₂	Fino	Jerez	Bodega
FJ ₃	Fino	Jerez	Bodega
FJ ₄	Fino	Jerez	Bodega
FJ ₅	Fino	Jerez	Bodega
FC ₁	Fino	Condado	Comercio
FM ₁	Fino	Montilla	Comercio
FM ₂	Fino	Montilla	Comercio
FM ₃	Fino	Montilla	Comercio
FM ₄	Fino	Montilla	Comercio
FM ₅	Fino	Montilla	Comercio
FA ₁	Fino	Aljarafe	Bodega

Tabla 5. Vinos finos

Muestra	Tipo vino	Origen	Procedencia
OJ ₁	Oloroso	Jerez	Bodega
OJ ₂	Oloroso	Jerez	Comercio
OJ ₃	Oloroso	Jerez	Comercio
OJ ₄	Oloroso	Jerez	Comercio
OJ ₅	Oloroso	Jerez	Comercio
OJ ₆	Oloroso	Jerez	Comercio
OM ₁	Oloroso	Montilla	Comercio
OM ₂	Oloroso	Montilla	Comercio
OM ₃	Oloroso	Montilla	Comercio
OC ₁	Oloroso	Condado	Comercio
OC ₂	Oloroso	Condado	Comercio

Tabla 6. Muestras de Vinos Olorosos

Muestra	Tipo Vino	Origen	Procedencia
AJ ₁	Amontillado	Jerez	Comercio
AJ ₂	Amontillado	Jerez	Comercio
AA ₁	Amontillado	Aljarafe	Comercio
AM ₁	Amontillado	Montilla	Comercio
CJ ₁	Cream	Jerez	Comercio
PJ ₁	Pale Cream	Jerez	Comercio

Tabla 7. Muestras de Vinos Amontillados y de Crianza Mixta

Muestra	Tipo de Vino	Origen	Año	Variedad	Procedencia
TG ₁	Tinto	Granada	1986	Cs, Tp	Bodega
TG ₂	Tinto	Granada	1988	Cs, Tp	Bodega
TG ₃	Tinto	Granada	1989	Cs, Tp	Bodega
TG ₄	Tinto	Granada	1990	Cs, Tp	Bodega
TG ₅	Tinto	Granada	1991	Cs, Tp	Bodega
TG ₆	Tinto	Granada	1992	Cs, Tp	Bodega
TG ₇	Tinto	Granada	1993	Cs, Tp	Bodega
TG ₈	Tinto	Granada	1993	Cs, Tp	Bodega
TG ₉	Tinto	Granada	1995	Cs, Tp	Bodega
TG ₁₀	Tinto	Granada	1996	Tp	Bodega
TG ₁₁	Tinto	Granada	1996	Cs, Tp	Bodega
TE ₁	Tinto	Granada	1996	Cs, Tp	Bodega
TB ₁	Tinto	Bailén	1993	Cn	Comercio
TC ₁	Tinto	Condado	1993	Cs, Tp	Comercio

Tabla 8. Vinos Tintos Andaluces. Cs: Cabernet Sauvignon; Tp: Tempranillo; Cn: Cencibel

Muestra	Tipo	Origen	Año	Procedencia
BC ₁	Blanco	Condado	1996	Comercio
BC ₂	Blanco	Condado	1995	Comercio
BC ₃	Blanco	Condado	-	Comercio
BC ₄	Blanco	Condado	1993	Comercio
BA ₁	Blanco	Aljarafe	1996	Bodega
BA ₂	Blanco	Aljarafe	1996	Bodega
BS ₁	Blanco	Sanlúcar	1996	Comercio
BJ ₁	Blanco	Jerez	1995	Bodega
MU ₁	Mosto	Aljarafe	1996	Comercio
MA ₁	Mosto	Aljarafe	1996	Bodega

Tabla 9. Vinos Blancos Andaluces y Mostos del Aljarafe

Productos en distintas fases de elaboración

Muestra	Prensa	Origen	Año	Procedencia
XJ ₁	Yema	Jerez	1996	Bodega
XJ ₂	MPL	Jerez	1996	Bodega
XJ ₃	MP	Jerez	1996	Bodega

Tabla 10. Muestras de Mostos de Prensa (*) D. O. Jerez de la Frontera.

MY: Mosto Yema MPL: Mosto Prensa Ligera. MP: Mosto Prensa

Muestra	Prensa	Origen	Año	Procedencia
XJ ₄	MY	Jerez	1997	Bodega
XJ ₅	MY	Jerez	1997	Bodega
XJ ₆	MY	Jerez	1997	Bodega
XJ ₇	MY	Jerez	1997	Bodega
XJ ₈	MY	Jerez	1997	Bodega
XJ ₉	MY	Jerez	1997	Bodega
XJ ₁₀	MPL	Jerez	1997	Bodega
XJ ₁₁	MPL	Jerez	1997	Bodega
XJ ₁₂	MPM	Jerez	1997	Bodega
XJ ₁₃	MPM	Jerez	1997	Bodega
XJ ₁₄	MP	Jerez	1997	Bodega
XJ ₁₅	MP	Jerez	1997	Bodega

Tabla 11. Muestras de Mostos de Prensa (*) D. O. Jerez de la Frontera.
 MY: Mosto Yema. MPL: Mosto Prensa Ligera.
 MPM: Mosto Prensa Mediana. MP: Mosto Prensa

Muestra	Uva	Año	Origen	Procedencia
XC ₁	Cs	1997	Granada	Bodega
XT ₁	Tp	1997	Granada	Bodega
XZ ₁	Za	1997	Condado	Bodega

Tabla 12. Muestras de Mostos de Diferentes Variedades de Uva.
 Cs: Cabernet Sauvignon; Tp: Tempranillo; Za: Zalema

Muestra	Año	Origen
SJ ₁	1986	Jerez
SJ ₂	1987	Jerez
SJ ₃	1988	Jerez
SJ ₄	1989	Jerez
SJ ₅	1990	Jerez
SJ ₆	1991	Jerez
SJ ₇	1992	Jerez
SJ ₈	1993	Jerez
SJ ₉	1994	Jerez
SJ ₁₀	1995	Jerez

Tabla 13. Muestras de Añadas de Sobretaba de Vino Fino (mosto yema), procedentes de bodega.

b) Muestras de vino usadas en los ensayos de digestión *in vitro*

En este estudio se analizaron un total de veinticinco vinos españoles, todos ellos obtenidos en el mercado: doce vinos tintos jóvenes de diversas variedades, seis vinos blancos y siete vinos generosos, de ellos dos finos dos manzanillas y tres olorosos (Tablas 14-16).

Muestra	Tipo	Origen
FJ ₆	Fino	Jerez
FM ₅	Fino	Montilla
FS ₁	Manzanilla	Sanlúcar
FS ₂	Manzanilla	Sanlúcar
OJ ₇	Oloroso	Jerez
OJ ₈	Oloroso	Jerez
OJ ₉	Oloroso	Jerez

Tabla 14. Vinos generosos empleados en ensayos de digestión, adquiridas en el comercio.

Muestra	Origen	Año	Variedad
TR ₁	Rioja	1997	Cs, Tp
TR ₂	Rioja	1997	Cs, Tp
TR ₃	Rioja	1997	Cs, Tp
TD ₁	R.Duero	1997	Cs, Tp
TD ₂	R.Duero	1997	Cs, Tp
TN ₁	Navarra	1997	Cs, Tp
TN ₂	Navarra	1997	Cs, Tp
TP ₁	Penedés	1997	Cs, Tp
TP ₂	Penedés	1996	Cs, Tp
TJ ₁	Jumilla	1997	Cs, Tp
TV ₁	Valdepeñas	1997	Cs, Tp
TV ₂	Valdepeñas	1997	Cs, Tp

Tabla 15. Vinos Tintos empleados en ensayos de digestión adquiridos en el comercio.

Cs: Cabernet Sauvignon; Tp: Tempranillo

Muestra	Tipo	Origen	Año	Procedencia
BC ₅	Blanco	Condado	1997	Comercio
BC ₆	Blanco	Condado	1997	Comercio
BV ₁	Blanco	Valdepeñas	1996	Bodega
BM ₁	Blanco	Montilla	1997	Bodega
BC ₄	Blanco	Sanlúcar	1993	Comercio
BR ₂	Blanco	Rueda	1996	Bodega

Tabla 16. Vinos blancos empleados en ensayos de digestión

4. 1. 2. Muestras Biológicas

Muestras de plasma humano

La toma de muestras de sangre humana se realizó en el Hospital Universitario Macarena (Universidad de Sevilla). Las muestras de plasma humano corresponden a cinco sujetos sanos (sin enfermedades hepáticas, renales ni alergias), no fumadores, no bebedores habituales.

La extracción de sangre se efectuó en ayunas. La sangre correspondiente, recogida en vacutainer con EDTA como anticoagulante, se sometió a centrifugación a 3000 rpm, 4°C durante 10 min. El plasma así obtenido se congeló a - 60°C en alícuotas de 1 mL hasta el momento del ensayo correspondiente.

Los ensayos con muestras fortificadas se hicieron con muestras de plasma de voluntarios sanos libres de compuestos fenólicos, lo cual se confirmó mediante análisis cromatográfico.

Muestras de orina

Los ensayos con muestras fortificadas se efectuaron con muestras de orina de voluntarios sanos. Las muestras estaban libres de compuestos fenólicos, lo cual se confirmó mediante análisis cromatográfico.

Para estudiar la presencia de fenoles en la orina se administró vino o mosto al individuo en ayunas, realizándose la toma de muestra a las dos horas y media de la ingesta.

Para el estudiar el perfil fenólico tras una dieta rica en fenoles dos voluntarios tomaron una dieta rica en frutas y verduras.

4. 2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES PATRÓN

4. 2. 1. Reactivos

a) Eluyentes de calidad HPLC

Los eluyentes de calidad HPLC usados fueron:

Acetonitrilo	Merck 114291
Ácido Acético glacial	Carlo Erba Art.401392

El agua empleada en la cromatografía para la preparación de las fases móviles se filtró mediante un sistema Milli-Q (Millipore).

b) Otros reactivos

Acetato de etilo	Panreac 141318
Ácido clorhídrico fumante 37%	Merck 100317
Ácido sulfúrico 98%	Merck100748
Ácido o-fosfórico 85%	Merck 100573
Ácido Tricloroacético	
Etanol 96% v/v	Panreac 141085
Fluoruro sódico	Merck 6449
Fosfato potásico monobásico	Panreac 141509
Hidróxido sódico	Merck 106498
Metanol	Merck 113351

c) Aminoácidos

L-Tyrosine, Sigma (T-2006) y L-Tryptophan, PIERCE (20065).

d) Enzimas

Pepsina, de estómago de perro, Fluka 77163.

Pancreatina, de páncreas de cerdo, Sigma P-1500.

e) Patrones

Se han empleado un total de diecisiete patrones comerciales, correspondientes a los principales compuestos fenólicos presentes en el vino que tienen interés desde el punto de vista de la salud y al siringaldehído.

Ácido gálico	Fluka	48630
Ácido protocatéquico	Sigma	P-5630
Ácido gentísico	Sigma	G-5254
Ácido p-hidroxibenzoico	Merck	821814
Tirosol	Fluka	56105
Catequina	Fluka	22110
Ácido vainílico	Sigma	V-2250
Ácido cafeico	Fluka	60020
Epicatequina	Fluka	45300
Siringaldehído	Sigma	S7602
Ácido p-cumárico	Fluka	28200
Ácido ferúlico	Merck	F-3500
Rutina	Sigma	R-5143
Miricetina	Sigma	M-6760
Trans-resveratrol	Sigma	R-5010
Morina	Sigma	M-4008
Quercetina	Fluka	83370
Kaempferol	Fluka	60010

f) Medios gastrointestinales artificiales

Las soluciones gástrica e intestinal fueron preparadas siguiendo las indicaciones de la Farmacopea Americana (*USP 23, 1995*) como se describe a continuación:

Solución gástrica: se disuelven 2.0 g de cloruro sódico y 3.2 g de pepsina en 7.0 ml de ácido clorhídrico y agua suficiente para un litro de disolución. La solución resultante ha de tener un pH de 1.2 aproximadamente.

Solución intestinal: se disuelven 6.8 g de fosfato potásico monobásico en 250 ml de agua, se mezcla y se añaden 190 ml de hidróxido sódico 0.2 N y 400 ml de agua. Añadir 10.0 g de pancreatina, mezclar y ajustar la solución resultante con hidróxido sódico 0.2 N a un pH de 7.5 + 0.1. Diluir con agua suficiente para un litro de disolución.

4. 4. 2. Disoluciones Patrón de Compuestos Fenólicos

a) Disolución I: Disolución patrón para la determinación de resveratrol y compuestos relacionados

Para la determinación de resveratrol y compuestos relacionados se preparó una disolución patrón hidroalcohólica (13 % v/v) de trans-resveratrol de concentración 29.5 mg/L. A partir de ella se realizaron diluciones sucesivas: 0.012; 0.059; 0.295; 0.590; 0.885 y 1.475 mg/L. Con estos valores se obtuvo la siguiente recta de calibrado: $y = 2.283x + 0.1745$ ($r = 0.997$).

b) Disolución II: Disolución patrón para los ensayos de digestión *in vitro*

Para estudiar el efecto sobre los compuestos fenólicos del proceso digestivo, se preparó una disolución patrón a las concentraciones que se señalan en la Tabla 17.

Fenol	mg/L	Fenol	mg/L
Ácido gálico	14.0	Ácido Ferúlico	24.0
p-Hidroxibenzoico	11.6	trans-Resveratrol	0.4
Tirosol	7.0	Catequina	7.2
Ácido Vainílico	8.0	Epicatequina	17.2
Syringaldehído	5.8	Rutina	31.4
Ácido Cafeico	11.0	Quercetina	12.0
Ácido p-Cumárico	44.0	Kaempferol	2.6

Tabla 17. Disolución Patrón II.

c) Disoluciones III y IV: Disoluciones de patrones para la determinación de compuestos fenólicos en muestras biológicas

Disolución III

Se prepara una disolución de patrones muy concentrada con el objeto de adicionar un volumen muy pequeño que no altere la naturaleza de la matriz. De cada compuesto se tomó la cantidad indicada, que se disolvió en metanol hasta 25 mL de disolución final, obteniéndose las concentraciones que se señalan en la Tabla 18. Esta disolución se mantuvo refrigerada a temperaturas comprendidas entre los 0-4°C, manteniéndose estable durante al menos cuatro semanas.

De dicha disolución III, se tomaron alícuotas para hacer diluciones en diferentes matrices, ya sea un medio hidroalcohólico o plasma, tal como se muestran en la misma Tabla.

Compuesto	Disol. III mg/L	III.1 mg/L	III.2 mg/L	III.3 mg/L	III.4 mg/L
Gálico	440	12.2	8.6	6.0	3.0
Protocatéquico	440	12.2	8.6	6.0	3.0
Gentísico	400	11.1	7.8	5.6	2.8
Tirosol	520	14.4	10.2	7.2	3.6
Catequina	480	13.3	9.4	6.7	3.3
Vainílico	440	12.2	8.6	6.0	3.0
Cafeico	440	12.2	8.6	6.0	3.0
Epicatequina	480	13.3	9.4	6.7	3.3
p-cumárico	680	18.9	13.3	9.5	4.7
Ferúlico	480	13.3	9.4	6.7	3.3
Rutina	480	13.3	9.4	6.7	3.3
Miricetina	160	44.4	3.1	2.2	1.1
Resveratrol	440	12.2	8.6	6.0	3.0
Morina	640	17.8	12.5	8.9	4.5
Quercetina	440	12.2	8.6	6.0	3.0

Tabla 18. Disolución patrón III. III.1, III.2, III.3 y III.4 = disoluciones de trabajo a partir de la anterior por dilución.

Disolución IV

Se trata de otra disolución de patrones muy concentrada, a partir de la cual se preparan diluciones a la mitad, cuarta y décima parte, que se utilizan para obtener las diferentes Disoluciones IV.1, IV.2, IV.3 y IV.4 (Tabla 19).

Estas disoluciones se mantuvieron refrigeradas, y durante el tiempo en que fueron empleadas se realizaron análisis rutinarios de las mismas para constatar su estabilidad.

Compuesto	DPMC IV mg/L	IV.1 mg/L	IV.2 mg/L	IV.3 mg/L	IV.4 mg/L
Gálico	356	11.5	5.8	2.9	1.2
Protocatéquico	528	17.0	8.5	4.3	1.7
Gentísico	536	17.4	8.7	4.3	1.7
Tirosol	1064	34.3	17.2	8.6	3.4
Catequina	320	10.3	5.2	2.6	1.0
Vainíllico	364	11.7	5.9	2.9	1.2
Cafeico	420	13.5	6.8	3.4	1.4
Epicatequina	548	17.7	8.9	4.4	1.8
p-cumárico	776	25.0	12.5	6.3	2.5
Ferúlico	460	14.8	7.4	3.7	1.5
Rutina	360	11.7	5.9	2.9	1.2
Resveratrol	256	8.3	4.2	2.1	0.8
Morina	408	13.2	6.6	3.3	1.3
Quercetina	632	20.4	10.2	5.1	2.0
Kaempferol	344	11.1	5.6	2.8	1.1

Tabla 19. Disoluciones patrón IV y de trabajo (IV.1; IV.2; IV. y IV.4) obtenidas a partir de la misma por dilución.

IV.1 = 0.1 mL de Disol. IV + 3 mL de agua, plasma, disolución tampón u orina.

IV.2 = 0.1 mL de Disol. IV/2 + 3 mL de agua, o plasma, o disolución tampón u orina.

IV.3 = 0.1 mL de Disol. IV/4 + 3 mL de agua, o plasma, o disolución tampón u orina.

IV.4 = 0.1 mL de Disol. IV/10 + 3 mL de agua, o plasma, o disolución tampón u orina.

d) Disolución V: Disoluciones de patrones para la obtención de los espectros de fluorescencia

Para obtener los espectros de excitación y emisión se prepararon disoluciones ($n = 6$) por separado de cada patrón, todas ellas con una concentración del orden 10^{-3} M. Las disoluciones de los patrones poco solubles en agua se realizaron en un 10% v/v de etanol.

La composición particular de cada disolución igual a la que presenta la fase móvil del gradiente cromatográfico cuando eluye cada compuesto fenólico.

e) Disolución VI: Disoluciones de patrones para el estudio de sensibilidad y validación de métodos

Se prepara una disolución de todos los patrones de los compuestos fenólicos, a partir de la cual se realizaron una serie de diluciones (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). Las concentraciones de estas disoluciones se muestran en la Tabla IV.14., expresadas en mg/L.

Compuesto	Puntos rectas calibrado (mg/L)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Gálico	7.00	5.6	4.2	2.8	1.4	1.12	0.84	0.56	0.28
Protocatéquico	3.85	3.08	2.31	1.54	0.77	0.62	0.46	0.31	0.15
Gentísico	4.63	3.70	2.78	1.85	0.93	0.74	0.56	0.37	0.19
Tirosol	3.63	2.90	2.18	1.45	0.72	0.58	0.44	0.29	0.15
Catequina	4.63	3.70	2.78	1.85	0.93	0.74	0.56	0.37	0.19
Vainíllico	3.90	3.14	2.36	1.57	0.79	0.63	0.47	0.31	0.16
Cafeico	2.85	2.28	1.71	1.14	0.57	0.46	0.34	0.23	0.11
Epicatequina	4.43	3.54	2.66	1.77	0.89	0.71	0.53	0.35	0.18
p-cumárico	3.28	2.62	1.97	1.31	0.66	0.52	0.39	0.26	0.13
Ferúlico	3.20	2.56	1.92	1.28	0.64	0.51	0.38	0.26	0.13
Rutina	4.55	3.64	2.73	1.82	0.91	0.73	0.55	0.36	0.18
Miricetina	14.25	11.4	5.7	2.85	0.57	0.46	0.29	0.06	0.01
Resveratrol	10.5	8.4	4.2	2.1	0.42	0.29	0.21	0.04	0.01
Morina	2.83	2.26	1.70	1.13	0.57	0.45	0.34	0.23	0.11
Quercetina	2.83	2.26	1.70	1.13	0.57	0.45	0.34	0.23	0.11
Kaempferol	3.20	2.56	1.92	1.28	0.64	0.51	0.38	0.26	0.13

Tabla 20. Concentración de los compuestos fenólicos (mg/L) en diferentes diluciones de patrones (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9).

4. 3. MATERIAL E INSTRUMENTACIÓN

La instrumentación empleada a lo largo de la realización de esta memoria, se detalla a continuación de forma general, y ha consistido en:

4. 3. 1. Cromatógrafo Líquido de Alta Eficacia

- Equipo cromatográfico Waters, formado por:

Inyector manual Rheodyne 7125

Bomba cuaternaria Waters 600E System Controller

Horno Waters Steel Column Heater Module

Bucle de inyección de 50 μ l.

Estación de datos Millennium 2. 0.

Detector de haz de fotodiodos Waters 996

Detector de fluorescencia Waters 474

- Columna Merck LiChrospher 100 RP-18 de fase reversa, tamaño de partícula 5 μ m; 250 \times 4 mm.; Ref. 50983

- Precolumna LiChroCART[®] 4-4; Cat. 50957; E. Merck

4. 3. 2. Aparato Disolutor

Aparato disolutor USP Turugrau automatizado. Se usa el método con paletas a 100 r.p.m y a temperatura constante de 37°C (*USP 23*).

4. 3. 3. Espectrofluorímetro

Espectrofotómetro de fluorescencia, con lámpara de Xenón, modelo F-2500 Fluorescence Spectrophotometer Hitachi.

4. 3. 4. Material de Laboratorio Diverso

- Agitadores magnéticos Selecta-P
- Baño de ultrasonido Selecta-P con capacidad de 0.5 L.
- Baño de ultrasonido Selecta-P con capacidad de 6 L.
- Bomba de vacío de membrana *Vacuubrand* “Schott Iberia”, de 1.7 m³/h.
- Cartuchos Sep-Pack C18 Supelco.
- Centrífuga Sorvall[®] TC.
- Evaporador Rotativo *VV*-micro “Heidolph”.
- Jeringa “Hamilton” de 25 µL
- Jeringas desechables de 5 y 10 mL.
- Lámpara UV "Atom" modelo A./70, nº 614, serie 02
- Micropipeta de volumen fijo “Nichiryo” de 10 µL
- Micropipeta de volumen fijo “Nichiryo” de 20 µL
- Micropipeta digital “Nichiryo” de 100 – 1000 µL
- Sistema de filtración de agua Milli-Q (Millipore)
- Software *Millennium 2010 Chromatography Manager* de Millipore (Milford, Massachusetts).
- pH-metro “Orion” 420A.

4. 3. 5. Filtros de jeringa

Acrodisc CR PTFE: membrana de politetrafluoroetileno; tamaño de poro 0.45 µm; Ref. WAT 200502; Gelman Sciences Acrodisc[®] de Waters

Acrodisc GHP: membrana de polipropileno hidrofílico; tamaño de poro 0.45 μm ; Ref. WAT 200514 Gelman Sciences Acrodisc[®] de Waters

Acrodisc LC PVDF: membrana de difluoruro de polivinilidino; tamaño de poro 0.45 μm ; Ref. WAT 200510 Gelman Sciences Acrodisc[®] de Waters

Acrodisc Nylon: membrana de nylon hidrofílico; tamaño de poro 0.45 μm ; Ref. WAT 200520 Gelman Sciences Acrodisc[®] de Waters

Anotop[®]: membrana de óxido de aluminio (Anopore[®]); tamaño de poro 0.2 μm ; Cat. No. 6809 1022 Whatman

Millex[®]-GV₁₃: membrana Durapore[®] de fluoruro de polivinilideno; tamaño de poro 0.22 μm ; Cat. No. SJGV 013 NS

Acetato: membrana de acetato de celulosa; tamaño de poro 0.45 μm ; Cameo

4. 4. MÉTODOS

4. 4. 1. Método Cromatográfico

Los compuestos fenólicos se han determinado por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE).

Se ha realizado una inyección directa de las muestras en el cromatógrafo, sin hacer ninguna manipulación previa, salvo una filtración, según el procedimiento propuesto por Roggero *et al.*, (1991).

La inyección directa, empleada también por otros autores (*Lamuela-Raventós et al.*, 1995; *Goldberg et al.*, 1996), presenta una serie de ventajas sobre aquellos métodos que precisan una manipulación previa de la muestra. De esta manera, la cuantificación es más precisa porque evita las posibles pérdidas en el proceso de extracción. Además las extracciones introducen errores en la cuantificación, pues éstas pueden no ser completas. También evita la posible alteración de la muestra, ya que con los cambios de pH pueden producirse reacciones de oxidación e hidrólisis. El medio ácido empleado normalmente en las extracciones, puede producir una hidrólisis de los glucósidos del resveratrol.

Por las razones expuestas, la inyección directa es la técnica ideal que nos garantiza la no alteración de la muestra que se va a analizar; es además la técnica más reproducible y la más rápida.

a) Gradientes de elución

Las fases móviles empleadas:

A: ácido acético 1%

B: ácido acético 6%

C: ácido acético/acetonitrilo/agua; 5/30/65; v/v/v

Fueron sometidas a un proceso de desgasificación, que se llevó a cabo con un baño de ultrasonidos y posteriormente se mantuvo con una agitación continua, gracias al empleo de los agitadores magnéticos.

a.1.) Determinación de resveratrol y compuestos relacionados por CLAE

Para la determinación de resveratrol y compuestos relacionados hemos usado un gradiente de elución constituido por las disoluciones B y C ya citadas (Roggero y Archier, 1994). El gradiente de elución se muestra en la Tabla 21.

Tiempo (min)	% A	% B
0	80	20
5	70	30
10	60	40
20	35	65
30	20	80
35	10	90
40	0	100

Tabla 21. Gradiente de elución para la determinación de resveratrol y derivados.

La temperatura de la columna cromatográfica es de 22°C. El flujo de elución es de 0.5 mL/min. El análisis de las muestras tiene una duración total de sesenta minutos. De todas las muestras se realizaron, al menos dos análisis.

a.2.) Determinación simultánea de compuestos fenólicos por CLAE

El análisis cromatográfico que realizamos consta de un gradiente de elución ternario con las tres fases móviles (A, B y C) descritas en el apartado anterior. El gradiente de elución se muestra en la Tabla 1 (Roggero *et al.*, 1991).

Tiempo	% A	% B	% C
0	100	0	0
15	0	100	0
30	0	100	0
40	0	95	5
50	0	90	10
60	0	80	20
70	0	75	25
80	0	70	30
100	0	35	65
120	0	0	100

Tabla 22. Gradiente de elución para la determinación de compuestos fenólicos.

b) Identificación de los compuestos fenólicos mediante CLAE y detector de fotodiodos

A la salida de la columna cromatográfica, las distintas sustancias se identifican gracias a un detector de fotodiodos; el cual toma datos de la absorbancia de una sustancia en un rango de longitudes de onda, definiendo de esta manera el espectro de absorción ultravioleta-visible correspondiente. La identificación se realiza atendiendo no sólo al tiempo de retención, como en otras cromatografías, sino también al espectro de absorbancia en la región ultravioleta-visible (UV-

VIS), ya que cada sustancia posee uno específico, dependiendo de su estructura química, que sirve para identificarla.

El detector de fotodiodos que hemos usado para nuestro estudio ha sido programado para tomar datos con una resolución de 2.4 nm. en el rango de longitudes de onda: 240 - 450 nm.

Para proceder a la identificación de una sustancia usamos un procedimiento de comparación espectral, que consiste en la superposición de los espectros correspondientes al compuesto que se pretende identificar y el de la sustancia patrón. El programa informático empleado traduce cada espectro a un vector de un espacio n-dimensional; donde "n" está relacionado con el número de datos tomados por los diodos implicados en la medida.

La diferencia resultante entre dos vectores, los que corresponden al patrón y al problema, se mide como un ángulo, indicativo de la medida en que se diferencian dos espectros. Si este ángulo es cero, podemos afirmar que el espectro del problema no presenta diferencias con el espectro de la sustancia patrón.

Para nuestras determinaciones incluimos en el programa del ordenador una biblioteca de espectros. Ésta se elaboró a partir del espectro obtenido de la disolución patrón de cada uno de los compuestos a determinar.

El espectro de la forma glucosidada es muy similar, prácticamente superponible, al de la forma libre correspondiente. Tienen el máximo de absorbancia a la misma longitud de onda, pero el glucósido aparece a un tiempo de retención bastante menor. Esto es debido a que la glucosa aumenta la polaridad del compuesto y en una cromatografía de fase reversa, eluyen antes las sustancias más polares. Con el método cromatográfico elegido vamos podremos identificar los siguientes compuestos fenólicos (Roggero, 1997):

Ácidos fenólicos y ésteres

Los ácidos gálico, protocatéuico, vainílico, cafeico, p-cumárico, siríngico, cafeiltartárico y cumariltartárico, son identificados y cuantificados con facilidad por este método. El fenol más abundante en el vino tinto es el ácido cafeiltartárico, que con frecuencia satura el detector, dando un pico ligeramente distorsionado. El ácido ferúlico se encuentra normalmente en muy bajas concentraciones en el vino, y el ácido p-hidroxibenzoico es difícil de detectar porque coeluye con

el abundante ácido cumaroyltartárico, y su concentración se encuentra normalmente por debajo de 1 mg/L. Los ésteres etílicos de cafeico y cumárico, se encuentran también en vinos envejecidos.

Para la identificación de los ésteres cafeoyltartárico, cumaroyltartárico, y sus glucósidos, se ha recurrido a los espectros suministrados en soporte informático por el profesor Roggero (Laboratoire de Chimie Organique et Analytique. Faculté de Sciences. Université d'Avignon) en las mismas condiciones cromatográficas del estudio.

El galato de etilo fue sintetizado a partir del ácido gálico por el método del trifluoruro de boro. El procedimiento consiste en añadir 2 mL del trifluoreterato de boro a 100 mg del ácido disuelto en 50 mL de etanol absoluto. Después de 48 horas, la cantidad de éster resultante es adecuada para la identificación espectral.

Catequinas y proantocianidinas

La (+)-catequina se distingue fácilmente, también la (-)-epicatequina, aunque ésta aparece en una zona más confusa del cromatograma.

Flavonoides y glucósidos

Aparecen en la última zona del cromatograma, con tiempos de retención que oscilan entre 100 y 130 minutos, y algunos coeluyen con antocianos, pero se distinguen porque los antocianos carecen de absorbancia entre 330 y 450 nm, mientras que los flavonoles absorben a 370 y sus glucósidos a 355 nm. Sin embargo, la parte del espectro comprendida entre 240 y 300 nm puede quedar distorsionada por la absorbancia de los antocianos. En este ensayo los antocianos no pueden ser separados e identificados por el alto pH de la fase móvil, se determinan en otra cromatografía que usa agua, ácido fórmico y acetonitrilo (Roggero *et al.*, 1997).

La quercetina es el flavonoide más abundante en el vino, y también son de interés dos de sus glucósidos: isoquercetina y rutina. La miricetina es menos importante, y kaempferol está ausente o en muy baja cantidad.

Otros

El tirosol, que procede de la descomposición de los aminoácidos tirosina o triptófano, es asimismo abundante en vinos y uvas.

También se identifican estilbenos como el resveratrol y una serie de compuestos con él relacionados, a los que dedicamos un capítulo completo de la presente memoria.

A modo de ejemplo, se incluye en el anexo un cromatograma de un vino de jerez con este gradiente.

Fenoles	Nº pico	t _R (min)	λ max (nm)
Ácido gálico	1	16.5	280
Ácido cafeiltartárico	2	24.5	330
Ácido p-hidroxibenzoico	3	31.7	280
Tirosol	4	33.2	280
Catequina	5	38.9	280
Ácido vainílico	6	46.8	260
Ácido cafeico	7	50.1	330
Galato de etilo	8	58.5	280
Epicatequina	9	67.5	280
Ácido p-cumárico	10	71.9	313
Siringaldehido	11	78.6	313
Ácido ferúlico	12	86.7	330
gl-t-resveratrol	13	94.8	307
Rutina	14	106.6	355
gl-c-resveratrol	15	108.2	280
trans-Resveratrol	16	112.3	307
cis-resveratrol	17	118.5	280
Quercetina	18	124.6	355
Kaempferol	19	135.7	355

Tabla 23. Tiempos de retención (t_R), longitud máxima (λ máx), y el número de pico con el que se identifican en los cromatogramas cada compuesto fenólico.

c) Cuantificación

La cuantificación de un compuesto determinado en una muestra problema se realiza en función de la señal de área que da el compuesto a la longitud de onda correspondiente a su máximo de absorbancia en el cromatograma. De esta manera se calcula una recta de calibrado para cada compuesto fenólico realizando sucesivas diluciones a partir de una disolución patrón.

Se han cuantificado fenoles de los que no se dispone de patrón comercial, como son el cis-resveratrol, glucósidos de trans- y cis-resveratrol y ésteres como el cafeiltartárico y el galato de etilo. La cuantificación del cis-resveratrol y su glucósido se llevó a cabo admitiendo un coeficiente de extinción molar $\epsilon = 12.000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Roggero y García-Parrilla, 1995). Los glucósidos y ésteres de los diferentes fenoles se han cuantificado con el mismo valor de extinción molar que los compuestos libres correspondientes, asumiendo que la unión de una molécula de glucosa no produce cambios significativos en la extinción molar (Roggero, 1997).

d) Identificación de los compuestos fenólicos mediante CLAE y detector de fluorescencia

La espectroscopía de fluorescencia molecular se incluye dentro de los métodos ópticos conocidos como procedimientos luminiscentes, que consisten en excitar las moléculas de un analito, lo que origina una especie que a su vez emite, pudiéndose usar la señal de emisión tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo. La fluorescencia proviene generalmente de una transición desde el primer estado electrónico excitado a uno de los niveles vibracionales del estado electrónico fundamental. La excitación tiene lugar por absorción de fotones, y las transiciones electrónicas que se producen no implican un cambio en el espín del electrón. Las técnicas fluorimétricas permiten la determinación cuantitativa de un gran número de especies orgánicas e inorgánicas a muy bajas concentraciones. La limitación que tienen es, precisamente, que son menos aplicables que los métodos de absorción ya que no todas las sustancias son capaces de emitir fluorescencia (Skoog and Leary 1980).

Salvando esta limitación, los métodos de fluorescencia tienen una serie de ventajas frente a la espectroscopía de absorción ultravioleta, que pueden resumirse en:

- Una alta sensibilidad, con límites de detección que son a menudo inferiores a los de espectroscopía de absorción.
- Un gran intervalo lineal de concentraciones, que es a menudo significativamente mayor que los encontrados en los métodos de absorción.
- Mejor selectividad que los métodos de absorción.

Cada compuesto fluorescente tiene un espectro de excitación y otro de emisión característicos ya que las propiedades fluorescentes de una sustancia están íntimamente ligadas a su estructura química. Los espectros de excitación se obtienen midiendo la intensidad luminiscente de emisión a una longitud de onda fija mientras se varía la longitud de onda de excitación. Por otro lado, los espectros fluorescentes de emisión implican una excitación a una longitud de onda fija. La fotoluminiscencia o emisión, normalmente tiene lugar a longitudes de onda más largas que la longitud de onda de excitación. Es muy frecuente que el espectro de excitación sea parecido al espectro de absorción ultravioleta, incluso que las longitudes de onda máximas de ambos coincidan. El espectro de emisión no varía significativamente cuando la longitud de onda de excitación es elegida dentro del intervalo de excitación. Es importante resaltar que la fluorescencia rara vez es el resultado de la absorción de radiación ultravioleta de longitudes de onda menores que 250 nm, ya que tal radiación es suficientemente energética como para producir una desactivación de los estados excitados (*Skoog and Leary 1980*).

La fluorescencia de un compuesto aromático con sustituyentes ácidos o básicos en el anillo, depende normalmente del pH. Es probable que las formas ionizadas y no ionizadas de un mismo compuesto tengan diferentes intensidades y longitudes de onda de emisión. Por tanto, los procedimientos analíticos basados en la fluorescencia suelen precisar de un control estricto del pH (*Skoog and Leary 1980*).

La alta sensibilidad de las determinaciones fluorimétricas en comparación con las fotométricas se debe al hecho de que en la fluorimetría se mide la intensidad de una señal pequeña, mientras que en la fotometría se mide una pequeña diferencia entre dos señales bastante considerables.

Para obtener los espectros de excitación y emisión se prepararon disoluciones por separado de cada patrón, todas ellas con una concentración del orden

10^{-3} M. Las disoluciones de los patrones poco solubles en agua se realizaron en un 10% v/v de etanol. La composición de estas disoluciones es la que tiene la fase móvil cuando eluye cada sustancia en particular.

En la siguiente Tabla se indica, para cada uno de los patrones ensayados, peso molecular (PM), tiempo de retención (T_R), composición de la fase móvil en la que eluye, y los máximos de excitación (λ_{ex}) y emisión (λ_{em}) obtenidos al realizar los correspondientes espectros en las condiciones ensayadas en disoluciones 10^{-3} M para cada compuesto.

Compuesto	PM	T_R	Fase móvil	λ_{ex}	λ_{em}	Intensidad
Gálico	188.14	17.8	100 %A	345	380	7-8
Protocatéuico	172.14	25.7	100 %A	340	370	5-6
Gentísico	154.1	35.1	100 %A	360	450	100
Tirosol	138.17	40.1	95 A + 5%B	285	305	4000
Catequina	290.28	42.0	95 A + 5%B	290	315	1600
Vainíllico	168.1	53.7	85 A + 15%B	280	360	740
Cafeico	180.16	55.5	85 A + 15%B	NF	NF	0.4
Epicatequina	290.28	70.7	75 A + 25%B	290	315	2300
p-cumárico	164.16	79.7	70 A + 30%B	355	410	2.5
Ferúlico	196.16	95.0	52 A + 48%B	365	445	21
Rutina	610.5	107.5	17 A + 83%B	NF	NF	--
Miricetina	318.2	116.7	9 A + 91%B	NF	NF	--
Resveratrol	228.2	118.7	5 A + 95%B	350	385	65
Morina	302.2	124.5	100 %B	NF	NF	--
Quercetina	338.27	128.7	100 %B	NF	NF	--
Kaempferol	286.24	143.4	100 %B	NF	NF	--

Tabla 24. Condiciones para la medida de la fluorescencia de los compuestos fenólicos
NF: no fluorescente

A continuación se muestran los correspondientes espectros de excitación y emisión obtenidos para cada fenol (Figuras 7 a 11).

ESPECTROS DE EXCITACIÓN Y EMISIÓN

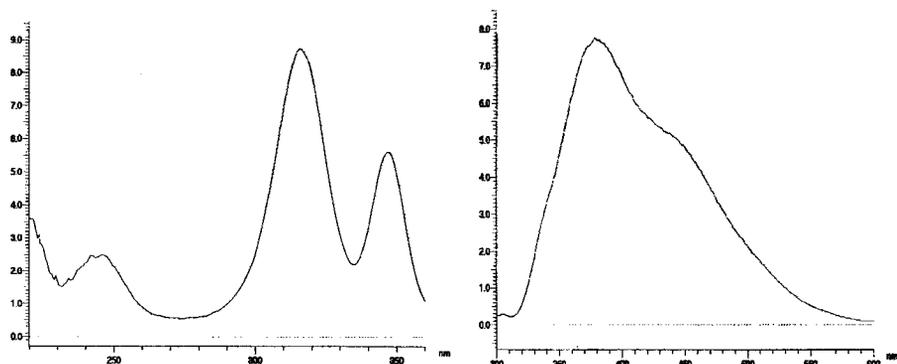


Fig. 5. Espectro de excitación del ácido gálico y espectro de emisión ácido gálico

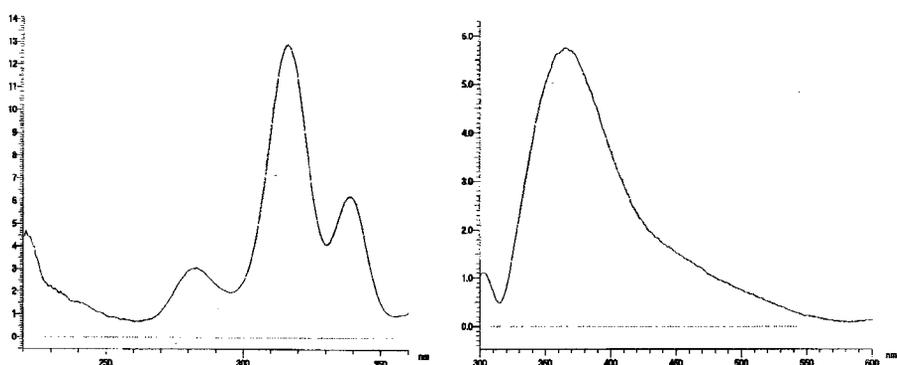


Fig. 6. Espectro de excitación ácido protocatéquico y espectro de emisión ácido protocatéquico

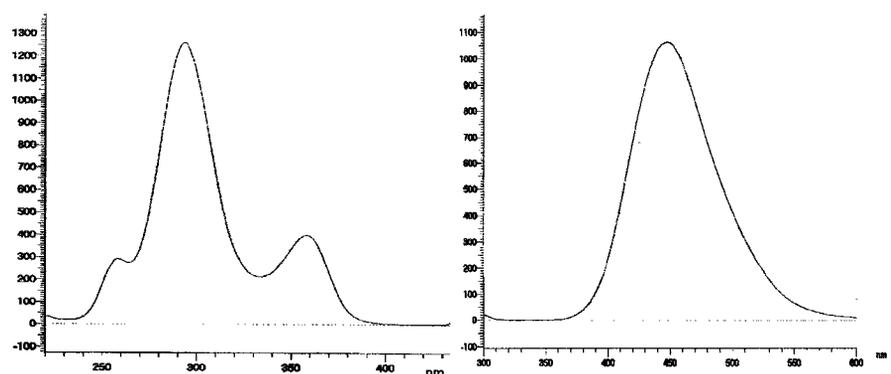


Fig. 7. Espectro de excitación ácido gentísico y espectro de emisión ácido gentísico

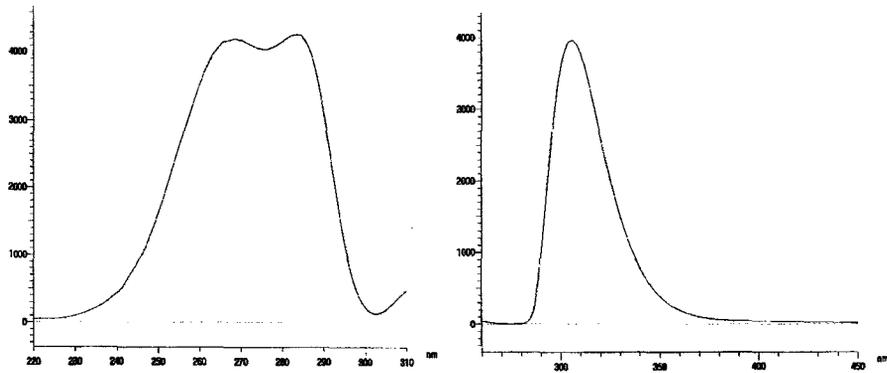


Fig. 8. Espectro de excitación tirosol y espectro de emisión tirosol

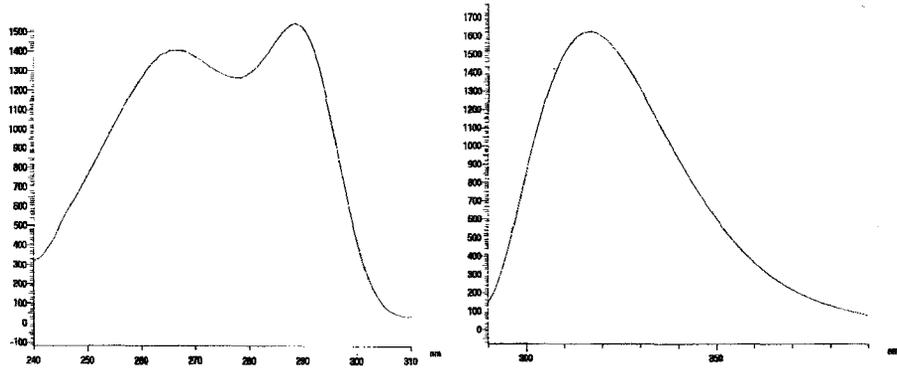


Fig. 9. Espectro de excitación (+)-catequina y espectro de emisión (+)-catequina

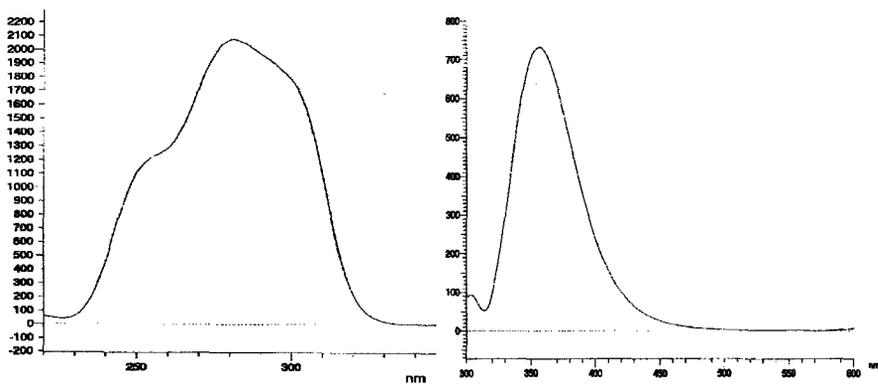


Fig. 10. Espectro de excitación ácido vainílico y espectro de emisión ácido vainílico

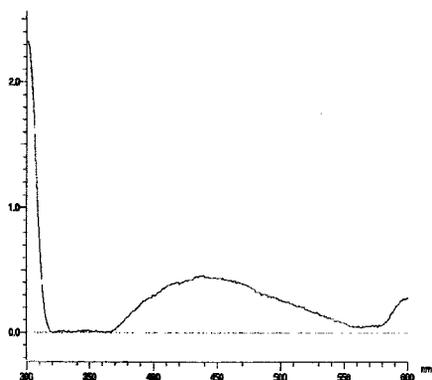


Fig. 11. Espectro de emisión ácido cafeico

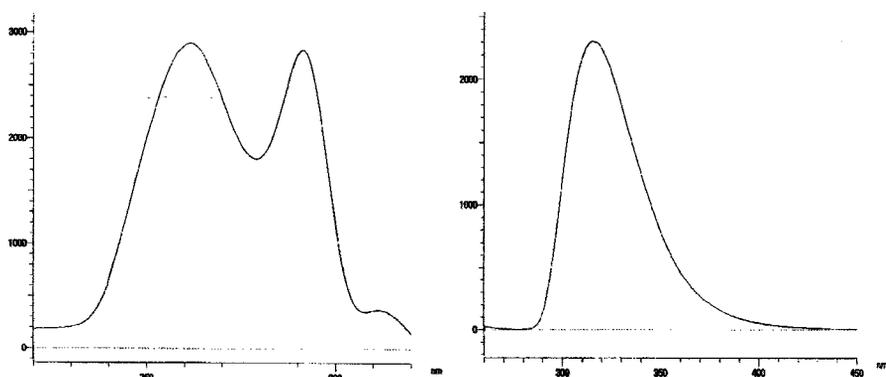


Fig. 12. Espectro de excitación (-)-epicatequina y espectro de emisión (-)-epicatequina

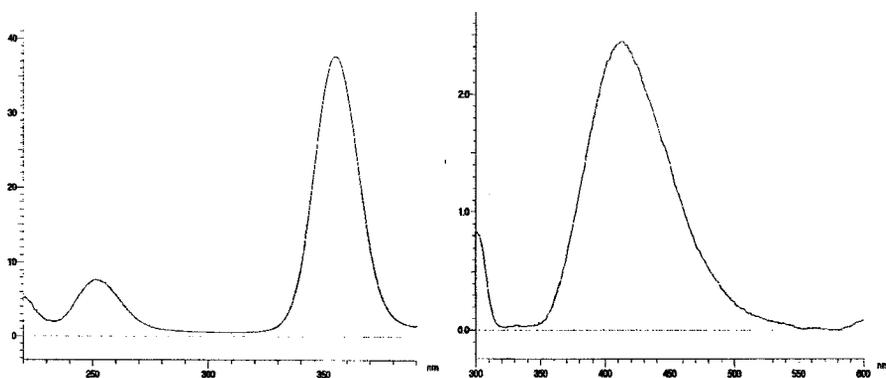


Fig. 13. Espectro de excitación ácido p.cumárico y espectro de emisión ácido p.cumárico

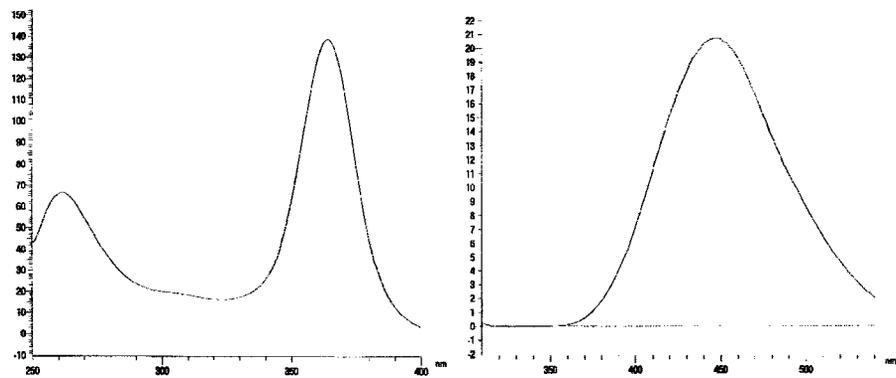


Fig. 14. Espectro de excitación ácido ferúlico y espectro de emisión ácido ferúlico

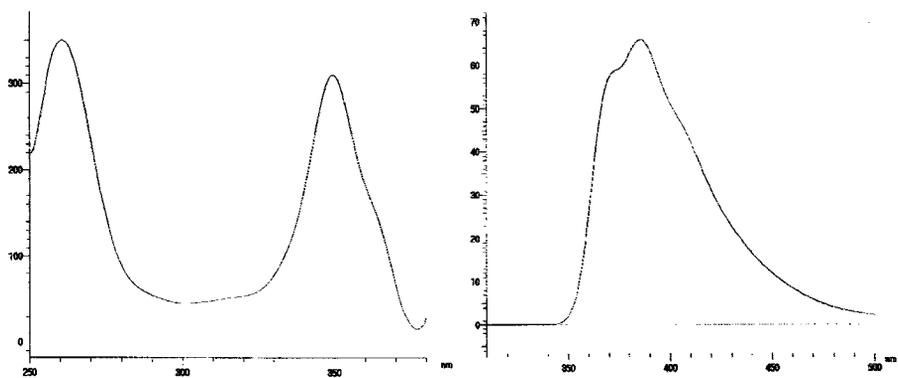


Fig. 15. Espectro de excitación del resveratrol y espectro de emisión resveratrol

4. 4. 2. Ensayos de Digestión Gástrica e Intestinal

Para emular los procesos digestivos se prepararon un medio gástrico y otro intestinal artificiales siguiendo las indicaciones de la Farmacopea Americana (*USP 23, 1995*).

Estos medios artificiales se llevan a un aparato disolutor automatizado, donde se mantienen en condiciones de agitación (100 rpm) y temperatura constante (37°C) durante el tiempo del ensayo. Se ha considerado adecuado media hora para el tratamiento en medio gástrico y dos horas para el tratamiento en medio intestinal.

Tanto una disolución patrón de catorce fenoles, como veinticinco muestras de vino, se sometieron a las condiciones gástricas e intestinales como se describe a continuación.

Una alícuota de 125 mL de vino o solución estándar, se trató con un volumen igual de solución gástrica durante media hora. Otra alícuota de 125 mL de vino o solución estándar, se adicionó de un volumen igual de solución intestinal durante dos horas. Por lo tanto, la concentración final de los fenoles en los tratamientos con los medios artificiales, queda así diluida a la mitad con relación a la muestra original. Este ensayo se realizó por triplicado para la disolución estándar y por duplicado para las muestras de vino.

4. 4. 3. Desproteización de Muestras de Plasma

a) Desproteización con tricloroacético

Este procedimiento de desproteización consiste en añadir 1 mL de ácido tricloroacético (1.2 mol/L) por cada 5 mL de muestra de plasma. Esta mezcla se incubó a 20 – 25°C durante diez minutos y luego se centrifugó (6000 rpm x 10 min). El sobrenadante así obtenido es totalmente transparente y de un volumen similar al volumen inicial de plasma, se puede filtrar e inyectar en el cromatógrafo.

b) Desproteización con etanol acidificado

El procedimiento consiste en añadir cuatro volúmenes de etanol acidificado por cada volumen de plasma que se analiza. La mezcla se incubó unos minutos

a temperatura ambiente, se somete a centrifugación (6000 rpm x 20 min) y el sobrenadante se lleva a sequedad en el rotavapor.

4. 4. 4. Inhibición de la Actividad Enzimática

El procedimiento empleado ha sido el siguiente: a una muestra de plasma se le añade fluoruro sódico sólido, en una proporción aproximada de un 1% en peso. La mezcla se somete a agitación en baño de ultrasonidos durante dos minutos. La viscosidad de la muestra aumenta enormemente, y para poderla filtrar y analizar por cromatografía es preciso llevar a cabo una desproteinización de la misma ya sea con etanol o con tricloroacético.

4. 4. 5. Estudio de Recuperación de los Fenoles en Plasma

Se tomaron cuatro alícuotas de una muestra de plasma (tratada con 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de ácido o-fosfórico y un 1% de ácido ascórbico). A cada una se le realizó la adición de patrón con 10 μL de una disolución concentrada del conjunto de fenoles en estudio (Disolución IV), obteniéndose los niveles de concentración recogidos en la Tabla 19 como IV.1, IV.2, IV.3 y IV.4. Cada una de las alícuotas fueron agitadas en baño de ultrasonidos durante tres minutos, tras lo cual se filtraron, y se realizó la inyección en el cromatógrafo. Cada muestra se analizó por duplicado. Con los valores obtenidos se obtuvo para cada fenol la correspondiente ecuación de adición de patrón calculada con cuatro puntos.

El mismo procedimiento se efectuó con disoluciones en medio hidroalcohólico a las mismas concentraciones para obtener las rectas de calibrado externo para cada fenol.

4. 4. 6. Extracción en Fase Sólida

La extracción en fase sólida es uno de los métodos de preparación de muestra más simple, efectivo y versátil. Permite separar el componente de interés de una muestra de las otras especies, pasando la muestra a través de un relleno cromatográfico y eluyendo selectivamente el compuesto deseado.

Existen dos tipos de estrategias en la extracción en fase sólida, combinando el tipo de cartucho y disolvente para que los compuestos que interesan sean:

1. no retenidos, se adsorben las interferencias
2. retenidos, las interferencias pasan por el cartucho sin ser retenidas

La primera estrategia se elige cuando los compuestos de interés se encuentran en elevadas concentraciones, y la segunda cuando están a niveles bajos o bien hay que aislar varios componentes de polaridades diversas. También se usa la segunda estrategia para concentrar el compuesto de interés caso de que se presente a niveles de traza.

Con el objetivo de comparar las recuperaciones obtenidas para la inyección directa se ha procedido a realizar una extracción en fase sólida con cartuchos C18, siguiendo la segunda estrategia. La extracción con cartuchos de este tipo se describe como un procedimiento muy adecuado para la determinación de fármacos en fluidos biológicos como plasma y orina. Es una fase poco selectiva porque puede retener compuestos de diferente estructura, también es la fase más apolar.

El procedimiento seguido ha sido: primero acidificación (10 μ l/mL de ácido o-fosfórico) y adición de ascórbico (1%) a la muestra, después la adición de patrón, seguidamente extracción con el cartucho y finalmente el análisis cromatográfico (*Juan et al, 1999; Ruiz-Gutiérrez et al., 2000*).

El procedimiento consiste en:

1. acondicionamiento, con 10 mL de metanol seguido de 10 mL de agua
2. carga de la muestra de plasma (un mL) diluida en agua
3. lavado con 3 mL de agua con etanol al 25%
4. elución con 5 mL de metanol puro

4. 4. 7. Extracción Líquido-Líquido en Plasma

a) Con acetonitrilo

Añadir a 0.5 mL de plasma 0.7 mL de acetonitrilo, centrifugar (6000 rpm x 5 min.) y el sobrenadante se filtra y se inyecta (*Carando et al., 1998*).

b) Con metanol

Añadir a 1 mL de suero 4 mL de metanol, agitar y centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se lleva a sequedad en rotavapor a vacío, se redissuelve en 1 mL 50% metanol-agua, se filtra y se inyecta en el cromatógrafo.

4. 4. 8. Desproteínización más Inhibición de Enzimas Plasmáticas**a) Desproteínización con tricloroacético más inhibición enzimática**

Se toma 1 mL de plasma, previamente tratado con fosfórico y ácido ascórbico y se le añade NaF. Se realiza la adición de patrón. Desproteínizamos añadiendo 0.4 mL de tricloroacético (1.2 mmol). Se obtiene 1 mL de sobrenadante, que se filtra e inyecta en el cromatógrafo.

b) Desproteínización con etanol acidificado más inhibición enzimática

Se toma 1 mL de plasma, al que se añaden 10 $\mu\text{L/mL}$ de ácido o-fosfórico y un 1% de ácido ascórbico. También se le añade NaF. Después se realiza la adición de patrón y se deja incubar en baño de ultrasonidos durante tres minutos. Posteriormente se le añaden 4 mL de etanol acidificado, se centrifuga y el sobrenadante se lleva a sequedad en rotavapor.

4. 4. 9. Estudio de Recuperación de Fenoles en Orina

Se realiza la adición de patrón a cuatro niveles de concentración (IV.1, IV.2, IV.3 y IV.4) a una misma muestra de orina libre de compuestos fenólicos. Se filtra e inyecta en el cromatógrafo líquido acoplado al detector de fotodiodos. Para cada compuesto se calcula la correspondiente recta de adición de patrón.

El mismo procedimiento se efectuó preparando disoluciones en medio hidroalcohólico a las mismas concentraciones para obtener las rectas de calibrado externo para cada fenol.

4. 4. 10. Extracción Líquido-Líquido en Muestras de Orina

El procedimiento empleado ha sido el descrito para la determinación de ácido ferúlico en orina (*Bourne y Rice-Evans, 1999*) y consiste en una extracción líquido-líquido, cuyo procedimiento es el siguiente: a 1 mL de orina se le añaden 100 μL de HCl (5M) y 2.4 mL de metanol. Se tapa y se mezcla bien durante 30

segundos. Se centrifuga a 800 g y 4°C durante 10 minutos. Se toma el sobrenadante y se elimina el metanol por evaporación en rotavapor a vacío a 40°C.

La fracción acuosa que resulta se filtra y se inyecta en el cromatógrafo líquido acoplado al detector de fotodiodos y al de fluorescencia conectados en serie.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. 1. DETERMINACIÓN DE RESVERATROL Y COMPUESTOS RELACIONADOS EN VINOS Y MOSTOS

Desde que se pusieron de manifiesto los efectos fisiológicos beneficiosos del resveratrol se suscitó un gran interés por determinar su contenido en los diferentes vinos de todo el mundo, ya que el vino es la fuente principal de resveratrol en la alimentación humana. En este sentido, se han analizado vinos procedentes de Francia (*Jéandet et al., 1993*), Suiza (*Adrian et al., 2000*), Estados Unidos (*Lamuela-Raventós y Waterhouse, 1993; Lamikanra et al., 1996*), España (*Lamuela-Raventós et al., 1995; Romero-Pérez et al., 1996b*), Italia (*Mattivi, 1993; Mozzon et al., 1996*), Portugal (*de Revel et al., 1996; Ribeiro de Lima et al., 1999*), Japón (*Sato et al., 1997*) y Eslovenia (*Vrhosek et al., 1995*). Sin embargo, hasta la fecha faltaban estudios de los vinos del sur de España.

En un principio, tan sólo se determinaba la forma trans-resveratrol (*Jéandet et al., 1993; Goldberg et al., 1994; 1995*). Más tarde, también se identificó su isómero cis-resveratrol (*Roggero y García-Parrilla, 1995*) y se determinaron ambos junto con las correspondientes formas glucosidadas (*Lamuela-Raventós et al., 1995; Goldberg et al., 1996*).

El objeto del presente estudio es la determinación de resveratrol en vinos y mostos elaborados en una región cálida, como es el sur de España, donde las altas temperaturas y las especiales técnicas empleadas en la elaboración del vino podrían afectar a la cantidad final de resveratrol en los mismos (*Martínez-Ortega et al., 2000b*).

Se ha elegido la técnica de la inyección directa, propuesta inicialmente por *Roggero y col. (1991)* para el análisis de compuestos fenólicos, y empleada más tarde para la determinación del resveratrol (*Roggero y Archier, 1994*).

5. 1. 1. Estudio de Filtración

Para alargar la vida de la columna cromatográfica, es conveniente filtrar la muestra antes de la inyección pues, de esta manera, se consigue eliminar partículas en suspensión de un tamaño tal que pudieran dañar seriamente la columna. Salvo la filtración, a la muestra no se le aplica ningún tratamiento. En la bibliografía

fía referida al análisis de resveratrol en vinos, se emplean muy diversos filtros de membrana de características químicas muy diferentes. Por citar algunos ejemplos, se han usado filtros de PVDF (*Pezet et al., 1994*), Waters (*Adrian et al., 2000*), PTFE (*Lamuela-Raventós y Waterhouse, 1993*) y Anodisc (*Lamuela-Raventós et al., 1995*), entre otros.

Así pues, se estimó conveniente realizar un estudio preliminar de filtración que muestra las diferentes capacidades de retención de cada filtro. Para ello, se procedió de la siguiente forma:

Se preparó una disolución hidroalcohólica de trans-resveratrol que se sometió a irradiación de luz ultravioleta ($\lambda = 360$ nm), obteniéndose a partir de ésta cis-resveratrol y el denominado compuesto B (*Roggero y García-Parrilla, 1995*).

A continuación, se realizó el análisis cromatográfico de esta disolución (*Roggero y Archier, 1994*), sin filtrar y filtrada con cada uno de los filtros, realizándose cada medida por triplicado. Se compararon las áreas obtenidas para cada compuesto en las disoluciones filtradas, con las áreas que se obtenían en la disolución sin filtrar. De esta manera, se pudo calcular el porcentaje retenido de cada compuesto con cada filtro. Debido a la interconversión cis-trans que se da en el equilibrio isomérico, las concentraciones de los distintos compuestos pueden variar a lo largo del tiempo, por lo que resultó imprescindible medir en cada sesión de trabajo la concentración de la disolución sin filtrar, y referir a ella los resultados de los filtros ensayados en esa jornada en términos de porcentaje de área del compuesto que se trate.

Antes de calcular el valor medio de los datos obtenidos por triplicado, se aplicó un test de rechazo de datos por el cual un dato es rechazable si el cociente entre su diferencia con el central y la diferencia entre el central y el tercero es superior a 1.5. De esta manera, siendo $x_1 > x_2 > x_3$

$$\text{se rechaza } x_1 \text{ si: } x_1 - x_2 / x_2 - x_3 > 1.5$$

$$\text{se rechaza } x_3 \text{ si: } x_2 - x_3 / x_1 - x_2 > 1.5$$

Los resultados media y desviación estándar, expresados en porcentaje de retención de área, se muestran en la siguiente tabla:

Filtro	t-Resv	c-Resv	B
Acetato	71.37 ± 0.91	43.99 ± 2.54	79.54 ± 2.99
Millex [®]	13.45 ± 1.85	2.19 ± 3.10	25.68 ± 3.44
PVDF	85.18 ± 3.99	67.57 ± 5.04	97.32 ± 0.40
Anotop [®]	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Nylon	97.43 ± 1.37	54.03 ± 7.72	99.22 ± 1.10
PTFE	6.81 ± 0.13	0.00 ± 0.00	24.41 ---
GHP	28.35 ± 0.12	---	---

Tabla 25. Porcentajes de retención de los filtros ensayados para: trans-resveratrol (t-Resv), cis-resveratrol (c-Resv) y el compuesto B.

A la vista de los valores de los porcentajes de retención obtenidos, consideramos que la elección del filtro se debe hacer cuidadosamente, ya que el empleo de un filtro inadecuado llevaría a cometer un error por pérdidas considerable.

Estos resultados corroboran otros datos que aseguran una retención superior al 60% de resveratrol para los filtros de Nylon y PVDF (*Lamuela-Raventós et al., 1995*).

El filtro seleccionado fue el Anotop[®], por su menor retención de los compuestos en estudio.

5. 1. 2. Niveles de Resveratrol en Mostos de Jerez de Diferentes Prensadas

Se estudia el contenido de trans- y cis-resveratrol y de sus correspondientes glucósidos en mostos obtenidos con distinto grado de prensa en dos campañas sucesivas, 1996 (n = 6) y 1997 (n = 12). Todas las muestras corresponden a uva de la variedad Palomino cultivada en el marco de Jerez de la Frontera (Tablas 5-13).

Los resultados obtenidos al analizar las muestras de ambas campañas se ofrecen en sendas tablas: 1996 (Tabla 26) y 1997 (Tabla 27).

Muestra	Tipo	t-Resv	c-Resv	Gl-t	Gl-c	Resv Total
XJ ₁	MY	0.045	-	0.053	0.587	0.685
XJ ₂	MPL	0.069	1.091	-	-	1.160
XJ ₃	MP	0.433	2.510	-	-	2.943

Tabla 26. Concentración (mg/L) de trans-resveratrol (t-Resv), cis-resveratrol (c-Resv), glucósidos de trans- (Gl-t) y cis-resveratrol (Gl-c) en Mostos de Distinta Prensada de la Vendimia de 1996 (var. Palomino).(-) no detectado

MY: Mosto Yema; MPL: Mosto Prensa Ligera; MP: Mosto Prensa

Muestra	Tipo	t-Resv	c-Resv	Gl-t	Gl-c	Resv Total
XJ ₄	MY	D	-	0.079	-	0.079
XJ ₅	MY	D	-	0.032	-	0.032
XJ ₆	MY	D	-	0.048	-	0.048
XJ ₇	MY	D	-	0.042	-	0.042
XJ ₈	MY	D	-	0.163	-	0.163
XJ ₉	MY	D	-	0.036	-	0.036
XJ ₁₀	MPL	D	-	0.031	-	0.031
XJ ₁₁	MPL	D	0.161	0.052	-	0.213
XJ ₁₂	MPM	D	0.275	0.032	-	0.307
XJ ₁₃	MPM	D	0.221	-	-	0.221
XJ ₁₄	MP	0.119	0.355	0.285	-	0.759
XJ ₁₅	MP	0.154	0.507	0.212	-	0.873

Tabla 27. Concentración (mg/L) de trans-resveratrol (t-Resv), cis-resveratrol (c-Resv), glucósidos de trans- (Gl-t) y cis-resveratrol (Gl-c) en Mostos de Distinta Prensada de la Vendimia de 1997 (var. Palomino).(-) no detectado; D: detectado, no cuantificable

MY: Mosto Yema

MPL: Mosto Prensa Ligera

MPM: Mosto Prensa Mediana

MP: Mosto Prensa

Efectivamente, se ha podido comprobar que al aumentar la presión ejercida aumenta la cantidad de resveratrol total en el mosto, siendo más de cuatro veces superior en el mosto de mayor prensa que en el mosto yema en la campaña de 1996 (Tabla 26) y más de diez veces en la de 1997 (Tabla 27).

Comparando los valores obtenidos en las dos campañas para cada tipo de prensa se observa que los niveles de resveratrol total obtenidos en 1996 son superiores a los de 1997. Se pueden explicar estas diferencias en base a las condiciones climáticas de los dos años. Así, el verano de 1996 fue suave, con muchos días con rocío, siendo la humedad relativa media en agosto de un 72'6%. Mientras que en agosto de 1997 la humedad relativa media fue de un 59'5%. Se dio la circunstancia de que 1996 fue un año de abundante pluviosidad después de un largo período de sequía y que la cosecha presentó un alto grado de infección por *Botrytis*.

Asimismo, hay que señalar la ausencia de glucósido *cis*-resveratrol en los mostos de la campaña de 1997. El glucósido de *trans*-resveratrol aparece en los mostos yema mientras que el estilbeno correspondiente sólo se puede detectar. Sin embargo, cuando aumenta la fuerza de la presión ya es mayor su presencia.

5. 1. 3. Niveles de Resveratrol en Sobretablas y Vinos Generosos

Se han analizado las concentraciones de resveratrol y compuestos relacionados en diez muestras de sobretablas y una serie de vinos generosos: doce finos, once olorosos y seis amontillados.

Las sobretablas son vinos de jerez mantenidos en botas antes de ser introducidos en el sistema de crianza oxidativa. En el caso que nos ocupa las muestras analizadas fueron sobretablas de mosto yema tomadas a lo largo de varios años desde 1986 a 1995 (Tabla 13).

Ninguna de ellas presentó ni resveratrol ni ninguno de sus compuestos relacionados. Este hecho podría explicarse por dos circunstancias. Una, la sequía sufrida por la zona durante esta década, ya que precisamente el mosto yema de 1996 (Tabla 26), año en que se restableció el régimen de lluvias normal de la zona, sí tiene estos compuestos en cantidades apreciables. La segunda, aunque no menos importante, es el tiempo transcurrido desde que se elaboraron cada una en su año, hasta que se analizaron todas ellas en 1996.

Tampoco se ha detectado ni resveratrol ni los compuestos relacionados en las doce muestras de vinos finos analizadas (Tabla 5, *Material y Métodos*). En la elaboración de vinos finos se intenta minimizar el contenido fenólico para evitar el pardeamiento o remontado. El fino se elabora a partir de mosto yema con un contenido reducido de resveratrol. Teniendo en cuenta que la duración mínima del proceso de soleras, según el reglamento de la Denominación de Origen de Jerez, ha de ser de tres años, durante el transcurso de este tiempo se podría perder el contenido inicial de resveratrol.

En el caso de los vinos olorosos y amontillados (Tablas 6 y 7 respectivamente), cabía esperar ciertos niveles de resveratrol, ya que para estos vinos se aprovechan las fracciones de MPM y MPL, junto con el mosto yema y /o vino fino que no ha superado los requisitos organolépticos para continuar la crianza biológica. La crianza debe tener una duración mínima de cinco años para los amontillados y de ocho para los olorosos. Sin embargo, los resultados obtenidos nos muestran que carecen de resveratrol. Y esto nos ha inducido a pensar que la crianza oxidativa que siguen estos vinos lo ha destruido, como han observado otros autores para vinos envejecidos (*Mattivi y Nicolini, 1993*).

5. 1. 4. Niveles de Resveratrol en Mostos de Uva

Se analizaron varios mostos obtenidos por estrujado de uvas maduras de tres variedades diferentes: dos tintas (Cabernet Sauvignon y Tempranillo) y una blanca (Zalema) (Tabla 12).

Aunque las condiciones en las que se realiza el prensado en el laboratorio no son idénticas a las utilizadas en bodega, la variedad tinta Cabernet Sauvignon presenta niveles más altos de resveratrol que la Tempranillo como es habitual en los estudios publicados al respecto (Tabla 27).

Mosto	t-Resv	c-Resv	Gl-t	Gl-c	Resv Total
Cs	0.187	-	-	-	0.187
Tp	0.114	-	-	-	0.114
Za	0.022	-	0.016	-	0.038

Tabla 28. Niveles de resveratrol en mostos de uvas (mg/L).
Cs: Cabernet Sauvignon; Tp: Tempranillo; Za: Zalema

Hay que hacer notar que el mosto de uva blanca (var. Zalema) presenta un contenido en resveratrol sensiblemente inferior frente a las variedades tintas.

5. 1. 5. Niveles de Resveratrol en Otros Vinos de Andalucía

Si bien el análisis de vinos generosos ha resultado infructuoso en cuanto a su contenido en resveratrol, no ha ocurrido lo mismo con otros vinos elaborados en distintas regiones andaluzas.

En la D.O. Condado de Huelva el proceso de vinificación en blanco para obtener vinos de mayor potencia aromática se lleva a cabo mediante una maceración del mosto con los hollejos de la uva, donde se localizan parte de los precursores del aroma de ésta. Tal práctica requiere la utilización de sistemas controlados (temperatura, agitación, aireación...) mediante depósitos autovaciantes de acero inoxidable, lo que constituye una importante novedad en este tipo de vinificaciones. Este paso, que dura tan sólo unas horas, favorece una pequeña extracción del resveratrol, junto con otros polifenoles. Los resultados de analizar diez vinos así elaborados y dos mostos, los ofrecemos en la siguiente tabla:

Muestra	t-Res	c-Res	Gl-t	Gl-c	Total
BC ₁	0.021	-	-	-	0.021
BC ₂	-	-	0.012	-	0.012
BC ₃	-	-	0.012	-	0.012
BC ₄	0.014	-	0.020	-	0.034
BA ₁	-	-	-	-	-
BA ₂	-	-	-	-	-
BS ₁	-	-	-	-	-
BJ ₁	0.028	-	-	-	0.028
BR ₁	0.044	-	-	-	0.044
MU ₁	0.023	-	-	-	0.023
MA ₁	0.062	0.184	-	-	0.246

Tabla 29. Niveles de Resveratrol y Derivados (mg/L) en Vinos Blancos jóvenes.

(-) no detectado

Sólo se ha encontrado cis-resveratrol en una de las muestras de vinos jóvenes del año, mientras que su glucósido correspondiente no se ha detectado en ninguna de ellas coincidiendo con los resultados de otros autores (*Goldberg et al., 1995; Soleas et al., 1995; Lamuela-Raventós et al., 1995*). No obstante, es de destacar que el cis-resveratrol, cuando está presente, es notablemente superior al isómero trans. Este efecto también lo observamos en las muestras de mostos de distintas prensadas (Tablas 26 y 27).

Además, se observa que la concentración de resveratrol total se mueve en un intervalo no muy amplio, de 0.012 a 0.044 mg/L. Sólo una de las muestras, (MA₁) que corresponde a un mosto del Aljarafe presenta un valor sensiblemente superior siendo tal muestra la única que presenta cis-resveratrol.

El estudio se ha realizado, asimismo, con vinos tintos elaborados en Andalucía en las zonas de Campocámara (Granada), Bailén (Jaén) y Bollullos del Condado (Huelva). Se ha encontrado resveratrol y sus compuestos relacionados en todas las muestras de vinos tintos, como era previsible esperar, debido a que la fermentación se realiza en contacto con las partes sólidas de la uva, lo que supone una disolución importante de estos compuestos en el vino. Los resultados se muestran en la Tabla 30.

Al comparar los valores de los vinos tintos de distintas zonas de España, parece claro que los tintos de D.O. Rioja (1.02-1.97 mg/L) superan notablemente a los de D.O. Valdepeñas (0.012-0.49 mg/L) en lo que se refiere a concentración de trans-resveratrol (*Peña et al., 1997*). En el caso de los tintos andaluces elaborados con las variedades Tempranillo y Cabernet Sauvignon, las muestras TG₁₀ y TG₁₁, correspondientes al año 1996, presentan valores muy similares a los de Rioja, mientras que el resto de las muestras, correspondientes a años de sequía, tienen valores cercanos a los vinos de Valdepeñas. De esta manera parece que las oscilaciones en el contenido de resveratrol están más relacionados con las condiciones climáticas que con el origen geográfico de los vinos.

Es de destacar que los niveles máximos de resveratrol total aumentan considerablemente en las muestras correspondientes a 1996 (año en que acabó la sequía), que son TG₁₀ y TG₁₁; sus valores doblan los niveles máximos de los años de sequía. Los vinos de TG₁ a TG₁₁ corresponden a dos vinos elaborados por la misma bodega. Estos resultados no son comparables a los de la muestra TE, tam-

bién del mismo año, porque en este caso se trata de un vino experimental obtenido en condiciones muy diferentes al resto.

Muestra	t-Resv	c-Resv	GI-t	GI-c	Resv Total
TG ₁	0.038	-	-	-	0.038
TG ₂	-	-	0.067	0.358	0.425
TG ₃	0.055	-	0.067	-	0.122
TG ₄	0.324	-	-	-	0.324
TG ₅	0.115	-	-	-	0.279
TG ₆	0.118	-	0.077	-	0.195
TG ₇	0.275	0.205	-	-	0.480
TG ₈	0.293	0.133	-	-	0.426
TG ₉	0.120	-	0.012	-	0.132
TG ₁₀	0.472	0.484	-	-	0.956
TG ₁₁	0.393	0.452	0.319	-	1.164
TE ₁	0.108	0.276	-	-	0.384
TC ₁	0.040	-	0.208	-	0.248
TB ₁	0.157	-	-	-	0.157

Tabla 30. Niveles de Resveratrol (mg/L) en Vinos Tintos
(-) no detectado

El glucósido cis sólo aparece en una de las muestras, superando en gran medida a su isómero trans. Este hecho también se observa en las muestras de mostos de prensa (Tablas 26 y 27) y en las de vino blanco (Tabla 29).

La relación entre isómeros trans / cis, para las variedades Tempranillo y Cabernet Sauvignon, ha sido estudiada (*Lamuela-Raventós et al., 1995*) en vinos tintos de la mitad norte peninsular (Penedés, Navarra, Ribera del Duero), encontrándose que la concentración del isómero trans es siempre muy superior a la del cis, unas cuatro veces superior. Sin embargo, nuestros resultados nos muestran cómo los dos isómeros, caso de estar ambos presentes, presentan concentraciones

similares. En alguna muestra incluso (TG₁₁, TE₁) el cis está en mayor cantidad que el trans.

Asimismo, se ha publicado que la razón: forma glucosidada / forma libre correspondiente, presenta valores característicos para ciertos tipos de vinos según la calidez de la zona de producción, y que en concreto para los vinos españoles y portugueses tiene un valor de cuatro unidades (*Goldberg et al., 1997*). Nuestros resultados, sin embargo, no corroboran esta teoría, como podemos observar en las Tablas 16, 17 y 18. Los resultados obtenidos por otros autores tampoco alcanzan la razón 4:1 y no presenta valores fijos (*Lamuela-Raventós et al., 1995; Peña et al., 1997*).

Podemos resumir que, en todos los vinos tintos analizados se ha encontrado trans- o cis-resveratrol o/y alguno de sus glucósidos, mientras que en las muestras de vinos blancos jóvenes se han encontrado alguno de estos compuestos en más de un 60% de las mismas. Por el contrario, ninguno de ellos han sido detectados en los vinos generosos analizados.

Por otro lado, se ha podido ver una relación entre el aumento de presión ejercida y los niveles de resveratrol total. También se ha corroborado que el factor ambiental influye en los niveles de resveratrol, porque los vinos elaborados en la etapa de sequía tenían niveles de resveratrol más bajos que otros elaborados en igualdad de condiciones pero con niveles de lluvia normales.

El cis-resveratrol y su glucósido se encuentran en pocas muestras, pero en las que están presentes la proporción de cis- sobre trans- es con frecuencia superior a la unidad.

5. 2. ENSAYO DE DIGESTIÓN APLICADO AL VINO: CAMBIOS EN SU COMPOSICIÓN FENÓLICA

Resulta interesante comprobar la estabilidad en los medios gastrointestinales que es lo que va a condicionar su absorción. La Farmacopea Americana o USP (*USP 23, 1995*) propone llevar a cabo ensayos de disolución, usando fluidos gastrointestinales artificiales, como ensayos previos y necesarios para evaluar la biodisponibilidad de los fármacos en comprimidos. En el caso de los comprimidos, lo que interesa ver es la velocidad de disgregación, porque el primer paso que condiciona la absorción es la liberación del principio activo, que implica que el fármaco se encuentra en disolución (*Flores et al., 1992*).

De modo análogo, se pueden aplicar al estudio de la biodisponibilidad de los nutrientes de los alimentos y se ha empleado en la estimación *in vitro* del hierro que se puede absorber de la carne (*Miller et al., 1981*) y de los aminoácidos y minerales biodisponibles en fórmulas infantiles (*Pérez-Llamas et al., 2000*). De igual manera se ha estudiado la biodisponibilidad *in vitro* de los flavonoides y otros fenoles presentes en el zumo de naranja (*Gil-Izquierdo et al., 2001*).

Por otro lado, se puede pensar que los compuestos de estructura química más compleja pueden verse afectados por los procesos digestivos. En este sentido se ha publicado que las condiciones ácidas del medio gástrico tienen un efecto sobre los oligómeros (de trímeros a hexámeros) de procianidinas del chocolate, provocando la hidrólisis de estos compuestos hasta liberar dímeros y monómeros de epicatequina (*Spencer et al., 2000*).

Aunque los estudios *in vitro* dan sólo información parcial, no dejan de ser orientativos y útiles sobre el estado de los compuestos en estudio en el paso previo a su absorción, que va a ser condicionante de la misma.

El propósito del presente trabajo es discernir si las condiciones gastrointestinales podrían afectar a los fenoles del vino, y evaluar su estabilidad o posible transformación en otros compuestos (*Martínez-Ortega et al., 2001*).

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos tras simular las condiciones gástricas e intestinales tanto con una disolución de patrones como con muestras de vino. Las concentraciones de todos los patrones en la disolución hi-

droalcohólica (12'5% v/v) se muestran en la Tabla 17 (Disolución II). Las muestras de vinos se describen en *Material y Métodos*, Tablas 14, 15 y 16.

El proceso digestivo artificial se realizó siguiendo las instrucciones de la Farmacopea Americana en un aparato disolutor como se describe en *Material y Métodos* pág.

Las concentraciones de todos los compuestos fenólicos se determinaron en la disolución patrón y en todas las muestras de vino antes y después de los tratamientos gástrico e intestinal mediante CLAE con detector de fotodiodos. Las condiciones cromatográficas han sido descritas previamente (*Roggero et al., 1991*).

En las Figuras 16-17 se muestran los cromatogramas obtenidos para un vino tinto antes (a) y después de los tratamientos gástrico (b) e intestinal (c). La numeración de los picos corresponde a la de la Tabla 23.

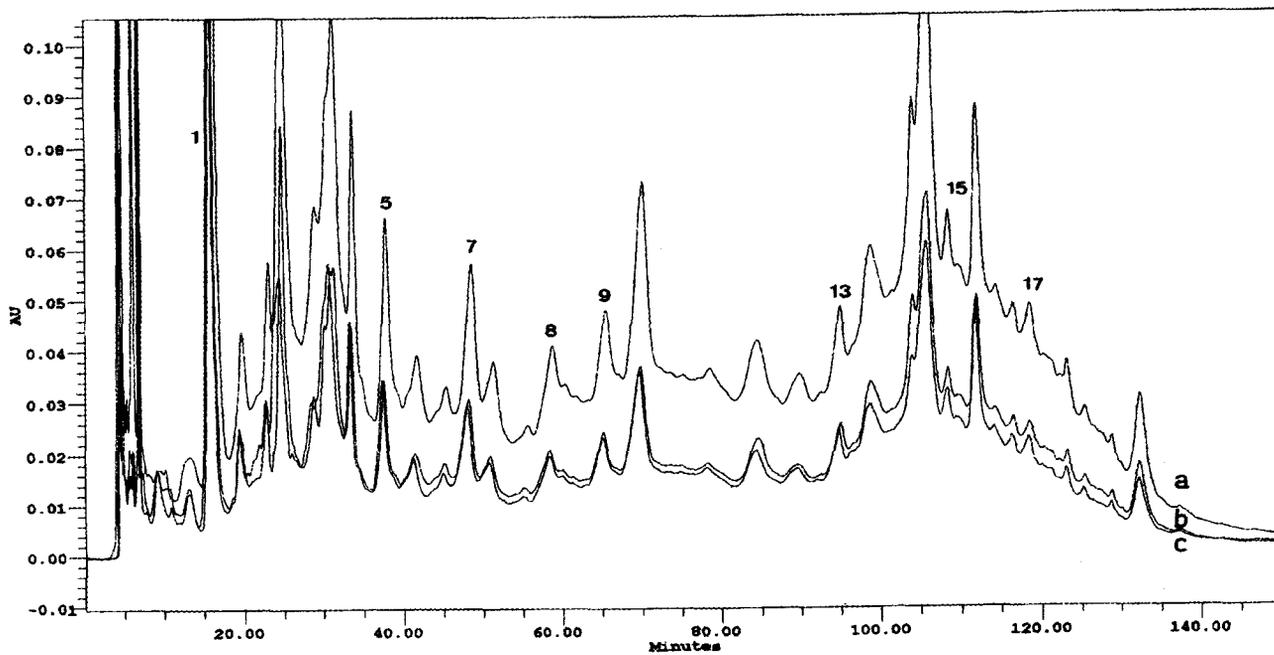


Figura 16: Cromatogramas obtenidos para un vino tinto antes (a) y después de los tratamientos gástrico (b) e intestinal (c) a 280 nm..

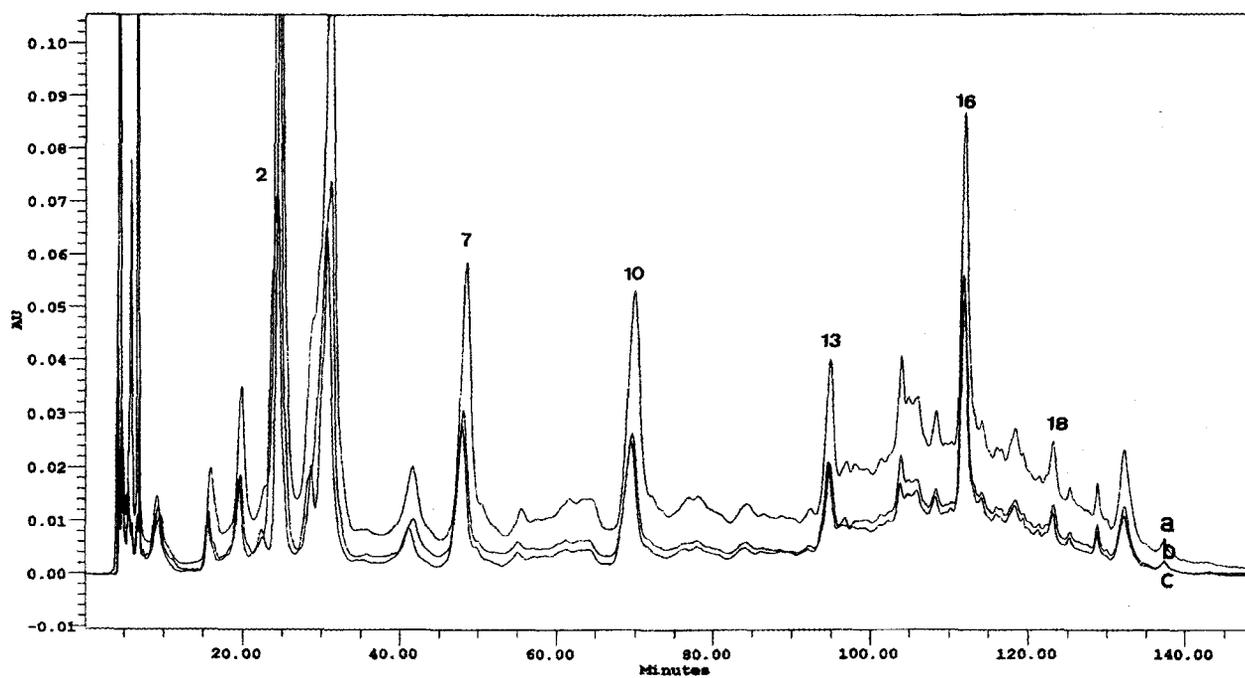


Figura 17: Cromatogramas obtenidos para un vino tinto antes (a) y después de los tratamientos gástrico (b) e intestinal (c) a 313 nm.

5. 2. 1. Evolución de una disolución de patrones sometida a digestión gástrica e intestinal

Las concentraciones encontradas para los compuestos fenólicos estudiados después de los tratamientos gástrico e intestinal se muestran en la Tabla 30. Como se puede observar, algunos compuestos resultan bastante estables, mientras que otros disminuyen sensiblemente.

Fenol	Inicial	Gástrico	Intestinal
Ácido gálico	7.0	7.0 ± 0.1	3.5 ± 0.1
Á. p-hidroxibenzoico	5.3	5.1 ± 0.6	5.0 ± 0.4
Tirosol	3.5	3.5 ± 0.2	3.4 ± 0.2
Ácido Vainílico	4.0	4.0 ± 0.1	3.5 ± 0.1
Siringaldehído	2.9	2.9 ± 0.2	2.9 ± 0.2
Ácido Cafeico	5.5	5.4 ± 0.4	5.0 ± 0.4
Ácido p-Cumárico	22.0	20.9 ± 0.7	20.3 ± 1.0
Ácido Ferúlico	12.0	11.4 ± 0.1	11.4 ± 0.7
trans-Resveratrol	0.2	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
Catequina	3.6	2.9 ± 0.2	2.8 ± 0.3
Epicatequina	8.6	7.6 ± 1.0	7.5 ± 0.4
Rutina	15.7	9.6 ± 0.8	7.9 ± 1.3
Quercetina	6.0	5.3 ± 0.8	2.3 ± 0.8
Kaempferol	1.3	1.2 ± 0.2	0.5 ± 0.5

Tabla 31. Evolución de una disolución patrón sometida a digestión gástrica e intestinal. Todos los datos son concentraciones expresadas como mg/L.

Es importante recordar que como resultado de la aplicación de los reactivos de los tratamientos la disolución que se ensaya (Tabla 17) queda diluida a la mitad (Tabla 31, columna Inicial).

Considerando este factor de dilución, se puede observar en la tabla que los compuestos fenólicos cuya concentración no se ve afectada tras el tratamiento con

el medio gástrico son: ácido gálico, ácido p-hidroxibenzoico, tirosol, ácido vainílico, siringaldehído, ácido cafeico, trans-resveratrol y kaempferol.

Asimismo, los flavonoides catequina, epicatequina, rutina y quercetina disminuyeron su concentración entre un 7.7 % y un 38.9 % aproximadamente.

Cuando la disolución patrón se sometió al medio intestinal, la mayoría de las concentraciones de los compuestos fenólicos disminuyeron en mayor medida que después del medio gástrico, probándose así que son más estables en condiciones ácidas. En el caso particular del ácido gálico, hay que señalar que su absorción molar está muy influenciada por el pH. Los siguientes compuestos no resultaron afectados: tirosol, ácido p-hidroxibenzoico, ácido vainílico, siringaldehído, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico y trans-resveratrol. Las concentraciones de todos los flavonoides ensayados (catequina, epicatequina, rutina, quercetina y kaempferol), disminuyeron sensiblemente (Tabla 31). Por todo lo expuesto se puede decir que el medio intestinal causa cambios más marcados que en el medio gástrico en la composición fenólica.

5. 2. 2. Ensayos de Digestión Gástrica e Intestinal Aplicados a Distintos Tipos de Vinos

Es necesario señalar que no todos los fenoles ensayados fueron encontrados en las muestras analizadas; algunos de ellos no fueron hallados en ninguno de los vinos como fue el caso de tirosol, ácido vainílico y siringaldehído. Además, otros fenoles fueron detectados en un bajo número de muestras, por lo que no se han podido extraer conclusiones. Este es el caso de ácido p-hidroxibenzoico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, rutina y kaempferol.

Los datos obtenidos para estos ensayos se recogen en la Tabla 32, donde las muestras se han agrupado atendiendo al tipo de vino. Seguidamente se explican los cambios más destacables.

La concentración de ácido gálico se incrementó en los vinos tintos y en los generosos tanto con el tratamiento gástrico como con el intestinal (Tabla 32). Tan sólo disminuyó ligeramente en alguna de las muestras de vino blanco tras el tratamiento intestinal. Este hecho podría ser debido a la presencia en el vino de estructuras químicas complejas como los taninos gálicos o el galato de proantocianidinas, especialmente en los vinos tintos, que podrían ser escindidos liberando así monómeros de ácido gálico (*da Silva et al., 1991*).

Compuesto	Vino	nº de muestras	Inicial	Gástrico	Intestinal
Ácido gálico	Blanco	3	1.2 ± 0.3	1.7 ± 0.5	0.9 ± 0.3
	Jerez	7	1.8 ± 0.9	2.6 ± 1.1	2.7 ± 1.1
	Tinto	11	9.1 ± 1.9	9.8 ± 2.3	10.5 ± 1.9
Galato de etilo	Tinto	5	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2
Ácido Cafeico	Blanco	3	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.2
	Jerez	3	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1
	Tinto	11	1.5 ± 1.0	1.5 ± 1.0	1.8 ± 1.0
Ácido	Blanco	6	5.4 ± 2.5	5.6 ± 2.7	5.7 ± 2.3
	Jerez	6	3.5 ± 1.6	3.8 ± 1.6	3.8 ± 2.0
Cafeiltartárico	Tinto	11	5.7 ± 1.8	5.6 ± 1.8	5.7 ± 1.7
	Tinto	6	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
gl-t-resveratrol	Tinto	6	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.2
gl-c-resveratrol	Tinto	6	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.3	0.7 ± 0.3
t-resveratrol	Tinto	7	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.3	0.7 ± 0.3
c-t-resveratrol	Blanco	1	0.1	0.2	0.2
	Tinto	5	0.6 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.4
Catequina	Blanco	2	2.4 ± 0.3	2.1 ± 0.2	2.6 ± 0.6
	Tinto	12	12.3 ± 2.8	13.7 ± 4.0	13.2 ± 3.1
Epicatequina	Tinto	10	8.5 ± 3.2	7.6 ± 1.9	7.6 ± 2.2
Quercetina	Tinto	6	2.3 ± 1.1	3.0 ± 1.4	3.2 ± 1.9

Tabla 31. Evolución de Vinos sometidos a digestión gástrica e intestinal. Todos los datos son concentraciones expresadas como mg/L.

Se ha efectuado el análisis de la varianza, ANOVA, para aquellos compuestos fenólicos en los que se producen variaciones tras los tratamientos. Se ha tomado como variable independiente el tipo de tratamiento (gástrico o intestinal) y como dependiente la concentración de cada fenol en cuestión. Los valores de p-level obtenidos para cada compuesto fenólico se ofrecen en la Tabla 33, donde p-level Gástrico se refiere a la comparación entre los niveles inicial y tras el tratamiento gástrico, p-level Intestinal, a la comparación entre los niveles inicial y tras

el tratamiento intestinal, y p-level Total a las variaciones en global de ambos tratamientos.

Compuesto	Tipo de vino	p-level Gástrico	p-level Intestinal	p-level Total
Ácido gálico	Blanco	0.567	0.539	0.207
	Generoso	0.200	0.046	
	Tinto	0.488	0.181	
	Total	0.763	0.095	
Ácido cafeico	Blanco	0.767	0.341	0.7
	Generoso	0.707	0.016	
	Tinto	0.912	0.866	
	Total	0.95	0.455	
Catequina	Blanco	0.875	0.683	0.808
	Tinto	0.554	0.816	
	Total	0.583	0.568	
Epicatequina	Tinto	0.375	0.444	0.495
Ácido p-cumárico	Generoso	0.876	0.882	
	Tinto	0.954	0.921	
	Total	0.926	0.971	
Quercetina	Tinto	0.244	0.352	0.525
Cumarato de etilo	Generoso	0.660	0.390	0.648
	Tinto	0.820	0.850	
	Total	0.639	0.381	
Cumariltartárico	Blanco	0.995	0.646	0.723
	Generoso	0.858	0.786	
	Tinto	0.724	0.488	
	Total	0.776	0.586	
Gl-Cumariltartárico	Blanco	0.935	0.976	0.971
	Generoso	0.946	0.511	
	Total	0.951	0.837	

Tabla 33. Análisis de la varianza (ANOVA). Valores “p” para los tratamientos gástrico, intestinal y total.

Al evaluar los resultados del ANOVA se puede comprobar que sólo hay dos casos en los que las diferencias observadas son significativas. En los dos casos se trata de vinos generosos tras el tratamiento con el medio intestinal, y los compuestos que varían son el ácido gálico y el ácido cafeico, aumentando su concentración significativamente respecto a los niveles iniciales. Este hecho está en

contraposición a lo observado para la disolución patrón, en la que ambos compuestos disminuían, y puede estar relacionado con la presencia en la compleja matriz del vino de polímeros como los taninos gálicos, que podrían ser escindidos durante el proceso digestivo.

El galato de etilo se ha detectado en unas pocas muestras, manteniéndose su concentración estable después de los tratamientos gástrico e intestinal (Tabla 32), como se podía esperar debido a su estructura de éster.

El ácido cafeico también se muestra estable tras los ensayos con los medios artificiales (Tabla 32) de la misma manera que en la disolución patrón (Tabla 31). Sin embargo, en alguno de los vinos generosos se pudo observar un ligero incremento de su concentración tras el tratamiento con el medio intestinal. El análisis de la varianza prueba que dicho aumento fue significativo ($p < 0.05$) (Tabla 33).

El ácido cafeiltartárico se mostró relativamente estable tras los dos tratamientos (Tabla 31), no siendo significativas las ligeras variaciones que se miden (Tabla 32).

Ambos isómeros de resveratrol, así como sus respectivos glucósidos han sido identificados y cuantificados en las muestras de vino. Aunque presentes en bajas concentraciones, estos compuestos han mostrado un comportamiento bastante estable tras las condiciones gástrica e intestinal (Tabla 32).

En relación a los flavonoides, los niveles de catequina se vieron incrementados en la mayoría de las muestras de vino tinto después del tratamiento gástrico pero no de forma significativa (Tabla 33). Los vinos blancos tienen menor cantidad de catequina, siendo los cambios menos marcados que en la solución patrón.

La concentración de epicatequina en vinos tintos disminuyó después del ensayo gástrico. Cambios similares fueron observados tras el medio intestinal (Tabla 32). La epicatequina mostró idéntico comportamiento en la disolución patrón y en las muestras de vino (Tabla 31).

La quercetina, sólo presente en vino tintos, incrementó su concentración después de ambos tratamientos. Catequina y quercetina parecen ser más estables en las muestras de vinos que en la disolución de patrones (Tabla 32). La querceti-

na es susceptible de autooxidarse a pH 7.5, pudiendo el vino actuar como un tampón que limitara este efecto.

En resumen, podemos decir que: al aplicar el ensayo de disolución a una disolución hidrolacohólica patrón de compuestos fenólicos, los flavonoides se ven afectados en una extensión mayor que los ácidos fenólicos simples, excepto para el ácido gálico que disminuyó cerca de un 50% tras el tratamiento intestinal debido al pH del medio.

En general, los compuestos fenólicos presentes en el vino parecen ser más estables a las condiciones gastrointestinales en el mismo que cuando se ensaya una disolución patrón. En las muestras de vino los niveles de ácido gálico aumentan en la mayoría de los casos, como también ocurre con catequina y quercetina.

El resveratrol y los compuestos relacionados, demostraron ser bastante resistentes a las condiciones gastrointestinales.

5. 3. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

5. 3. 1. Establecimiento de las Condiciones para la Medida por Fluorescencia de los Compuestos Fenólicos del Vino

Los espectros de excitación y emisión para cada compuesto se han obtenido gracias a un fluorímetro. Ni los componentes de las fases móviles (ácido acético, acetonitrilo y agua) ni el etanol empleado para disolver algunos patrones, son fluorescentes, por lo que no interfieren. Pero el espectro de fluorescencia sí que puede variar en función del pH. Para evitar interferencias debido a ello el espectro de cada sustancia se ha registrado disolviendo cada patrón en una disolución con idéntica composición de la fase móvil en la que eluye, es decir, teniendo en cuenta el gradiente de elución del método cromatográfico empleado (Tabla 24). Así se obtuvieron los espectros de fluorescencia de cada compuesto en condiciones similares a las que habrá en el eluato cuando dichos compuestos alcancen el detector de fluorescencia.

Los espectros de excitación y emisión obtenidos se muestran en las Figuras 5 a 15. Las longitudes de onda elegidas son aquellas que presentan intensidades máximas en cada espectro. En el caso de presentar más de un máximo de excitación (ocurre con los ácidos gálico, protocatéquico y gentísico entre otros) se elige la longitud de onda mayor, aunque sea de menor intensidad ya que es preferible excitar a longitudes de onda más largas.

Los flavonoles: quercetina, morina y miricetina no presentaron fluorescencia alguna, tal como era de esperar porque las sustancias altamente pigmentadas no suelen ser fluorescentes. Es de destacar el caso de los compuestos con estructura química derivada del ácido cinámico: cafeico, p-cumárico y ferúlico. El cafeico no es fluorescente pues aunque da una pequeña señal de emisión en torno a los 440 nm, dicha señal es de menor intensidad que la de distorsión que aparece a la izquierda del espectro (Fig. 11). Esta señal de dispersión inherente a todo espectro de fluorescencia, se observa claramente en el caso de compuestos no fluorescentes, siendo inapreciable en el caso de compuestos fluorescentes, cuya emisión supera con creces el citado valor de dispersión.

El ácido p-cumárico presenta cierta fluorescencia, aunque discreta, como lo prueba el hecho de que la señal de dispersión sigue siendo notable (Fig. 7) mientras que el ácido ferúlico (Fig. 8) sí es fluorescente y la señal de dispersión ya no es relevante frente a la señal de emisión del propio compuesto. Se observa cómo la introducción de un grupo metoxilo, afecta a la fluorescencia aumentándola.

La intensidad de la fluorescencia de los compuestos fenólicos ensayados en orden de mayor a menor intensidad, fueron: tirosol, epicatequina, catequina, ácido gentísico y ácido vainílico. El resveratrol presenta una fluorescencia intermedia. Y los menos fluorescentes, también en orden decreciente son: ácido ferúlico, ácido gálico, protocatéquico y p-cumárico.

Los resultados obtenidos difieren de los encontrados en la bibliografía para determinados compuestos como ácido gentísico, tirosol, (+)-catequina y trans-resveratrol (*Carando et al., 1999*). Los valores que establecen estos autores para las longitudes de onda máximas de excitación (λ_{ex}) y emisión (λ_{em}) son los siguientes:

Compuesto	λ_{ex}	λ_{em}
Ácido gentísico	230	446
(+)-catequina	275	322
Tirosol	275	313
Trans-resveratrol	298	385

Tabla 34. Condiciones de excitación y emisión.

Las diferencias que se observan se pueden explicar porque los espectros de fluorescencia fueron obtenidos en otras condiciones, y los espectros de fluorescencia pueden verse muy afectados al variar el pH. Además, el gentísico tiene dos máximos de excitación y se ha elegido el primero, cuando quizá sería más adecuado elegir el segundo por dos razones: se prefiere excitar a las longitudes de ondas más largas y la excitación por debajo de los 250 nm no es recomendable (*Skoog y Leary, 1980*).

A partir de los datos obtenidos, se ha diseñado una programación del detector de fluorescencia en la que se varían las condiciones de excitación y emisión en función del tiempo de retención de cada uno de los patrones susceptibles de ser cuantificados por fluorescencia. En esta programación se han tenido en cuenta todos los compuestos fenólicos que dan alguna señal de emisión, aunque ésta sea pequeña, para ver si es posible determinarlos todos ellos por fluorescencia. El resto de condiciones que se fijaron en el detector de fluorescencia fueron: modo de filtro digital 3s, atenuación 32, anchura de banda 18 y ganancia 1000. Queda así dividido el análisis cromatográfico en una serie de etapas o intervalos de tiempo, tal como se muestra en la siguiente Tabla:

Intervalo de Tiempo (min)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Compuesto
0 - 20	345	380	Gálico
20 - 30	340	370	Protocatéquico
30 - 38	360	450	Gentísico
38 - 48	290	310	Tirosol, Catequina
48 - 60	280	360	Vainillico
60 - 75	290	315	Epicatequina
75 - 85	355	410	p-cumárico
85 - 100	365	445	Ferúlico
100 - 125	350	385	Resveratrol

Tabla 35. Programación del detector de fluorescencia.

Al aplicar este programa en el detector de fluorescencia durante el análisis cromatográfico de las diferentes disoluciones de patrones se obtuvieron cromatogramas como los siguientes para el detector de fotodiodos (Fig. 18) y para el detector de fluorescencia (Fig. 19).

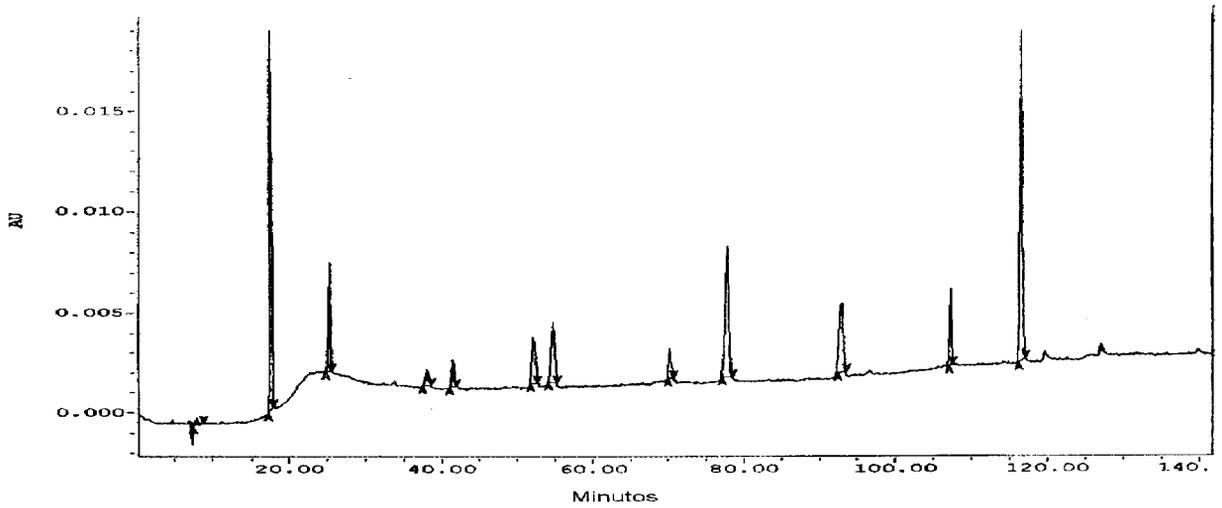


Fig. 18. Análisis mediante CLAE y detector de fotiodos (280 nm) de disolución patrón IV.1.

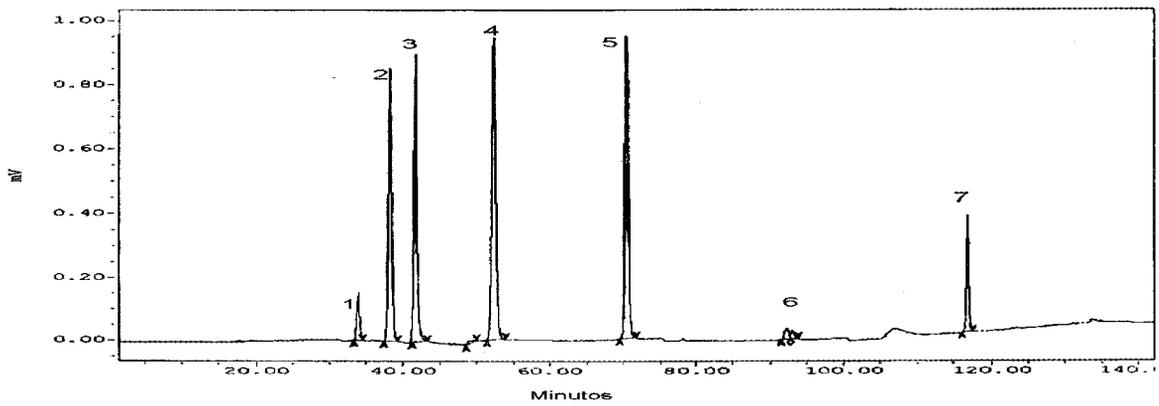


Fig. 19. Análisis mediante CLAE y detector de fluorescencia de la disolución patrón IV.1.

En el cromatograma obtenido con el detector de fluorescencia (Fig. 19) se puede observar que hay compuestos que no dan una señal suficiente para ser analizados mediante fluorescencia. Estos son ácido gálico, protocatéquico y p-cumárico. Otros, como el ácido gentísico (pico 1) y ferúlico (pico 6), dan una señal muy pequeña. Se puede ver también que los compuestos fenólicos que mejor se presentan mejores propiedades fluorescentes son tirosol (pico 2), (+)-catequina (pico 3), ácido vainílico (pico 4), (-)-epicatequina (pico 5) y resveratrol (pico 7).

5. 3. 2. Aplicación de la fluorescencia a muestras biológicas

Aplicación de la fluorescencia a muestras de plasma

Con el objeto de ensayar la aplicabilidad de la fluorescencia a muestras de plasma se ha procedido de la siguiente manera.

Una muestra de plasma se filtra (Anotop 0.22) y se inyecta en el equipo cromatográfico con los dos detectores, fotodiodos y fluorescencia, conectados en serie (Figuras). El análisis cromatográfico se realiza aplicando las condiciones descritas para la determinación simultánea de compuestos fenólicos (Roggero *et al.*, 1991).

El cromatograma así obtenido con el detector de fluorescencia programado como se ha descrito, presenta un pico que satura en gran manera el detector entre los minutos 42 y 67. Con el uso del detector de fotodiodos pudimos obtener su espectro UV-VIS e identificar este pico con el aminoácido l-triptófano. Otro aminonoácido que también fue identificado fue la l-tirosina por el mismo procedimiento de comparación espectral. A continuación se ofrecen los cromatogramas de la muestra de plasma con ambos detectores.

Para estudiar las propiedades fluorescentes de estos dos aminoácidos se prepararon por separado los correspondientes patrones en disoluciones de 10^{-3} M y se obtuvieron los correspondientes espectros de excitación y emisión.

Los espectros de excitación y emisión de ambos aminoácidos se muestran a continuación en las figuras 20 y 21.

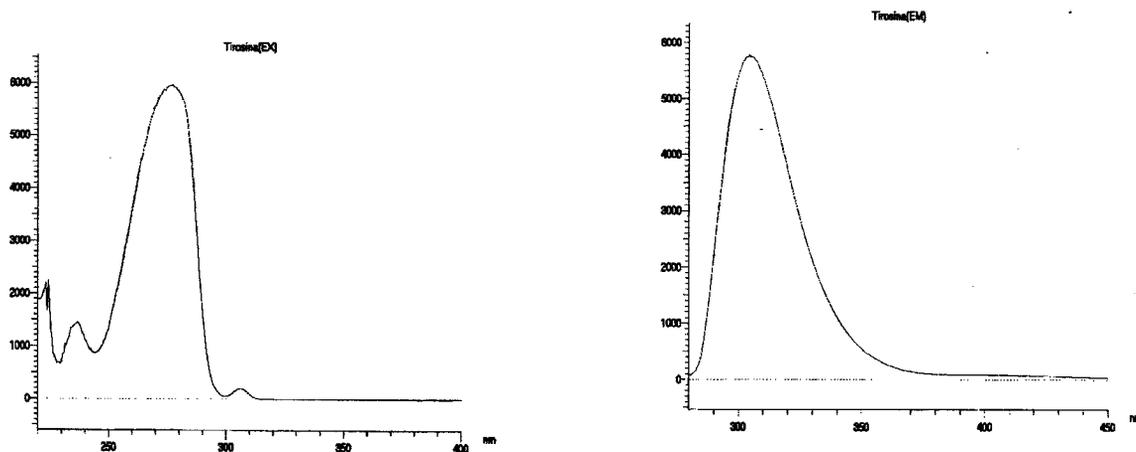


Fig.20. Espectros de excitación y emisión de Tirosina.

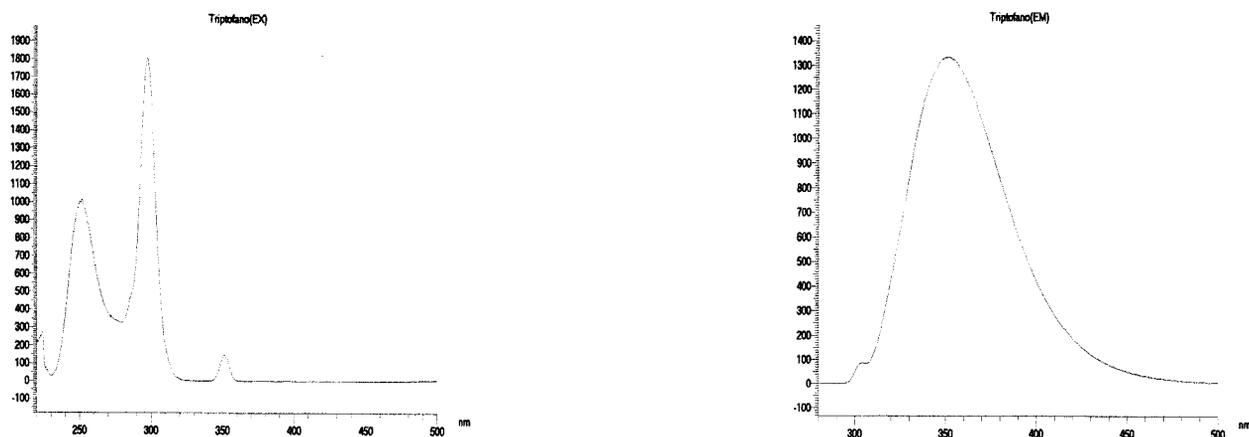


Fig.20. Espectros de excitación y emisión de Triptófano.

Ambos son bastante fluorescentes, tal como se recoge en la siguiente tabla (Tabla 36) donde se ofrecen sus tiempos de retención, y máximos de excitación y emisión.

Compuesto	TR	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Intensidad
l-tirosina	12	275	305	5700
l-triptófano	43	250 y 300	350	1300

Tabla 36. Propiedades fluorescentes de los aminoácidos.

Puesto que el pico fluorescente de triptófano supone una interferencia considerable, se procede a variar la programación del detector para minimizar su señal. Con tal propósito se eligen: como excitación 270 y como emisión 290 nm entre los minutos 42 y 67.

Con estas modificaciones el detector de fluorescencia permite la corroboración de los compuestos identificados por el fotodiodo como tirosol, catequina, ácido vainílico, epicatequina y resveratrol en muestras de plasma.

Aplicación de la fluorescencia a muestras de orina

Para ver la aplicabilidad del detector de fluorescencia a muestras de orina se toma una muestra de orina que se filtra e inyecta en el equipo cromatográfico con los dos detectores, fotodiodo y fluorescencia, conectados en serie.

Se realiza el gradiente cromatográfico para la determinación simultánea de compuestos fenólicos (Roggero *et al.*, 1991). Con el detector de fluorescencia, programado como se había establecido anteriormente, aparecen un gran número de picos fluorescentes a lo largo de todo el cromatograma que imposibilitan la determinación de cualquier compuesto.

A la vista de los resultados, se optó por el gradiente cromatográfico propuesto para la determinación de los compuestos fenólicos menos polares (Roggero y Archier,

1994), manteniendo el detector de fluorescencia durante todo el análisis con longitudes de onda de excitación y emisión fijas para detectar trans-resveratrol y su glucósido que son los únicos compuestos fluorescentes de interés que se pueden detectar en estas condiciones.

5. 3. 3. Validación del Método mediante CLAE con Detector de Fotodiodos y de Fluorescencia Acoplados en Serie Para Muestras Biológicas

La validación de un método es la comprobación de que las características de realización del método propuesto son adecuadas para el uso que se persigue. Tanto la Farmacopea Americana (USP) como la Food and Drug Administration (FDA) han propuesto protocolos de validación de métodos analíticos de compuestos químicos, sin embargo, no existen directrices oficiales concernientes a los métodos de análisis de fluidos biológicos (Huber, 1998).

La validación supone la evaluación o determinación de una serie de parámetros, como son: linealidad, límites de detección y cuantificación, selectividad, estudios de recuperación y precisión. Sin embargo, es necesario puntualizar que no existe una guía oficial sobre el orden de los experimentos a llevar a cabo, la secuencia que se emplee dependerá del propio método que se desarrolle. Para los métodos de cromatografía líquida, se puede seguir el siguiente orden (Huber, 1998):

1. selectividad de los patrones, optimizando la separación y determinación de disoluciones patrones.
2. precisión de los tiempos de retención y las áreas de los picos.
3. intervalo de linealidad, límites de detección y cuantificación.
4. selectividad con muestras reales.
5. precisión a diferentes concentraciones.

El método cromatográfico empleado fue descrito inicialmente para la determinación de compuestos fenólicos en vinos (Roggero *et al.*, 1991), y como tal se ha empleado profusamente. En los estudios de la presente Memoria se acopla un detector de fluorescencia en serie y se aplica a muestras biológicas, por lo que se ha considerado oportuno validarlo convenientemente.

a) Linealidad

Se ha evaluado la linealidad de la respuesta de ambos detectores. La linealidad establece una correlación lineal entre la respuesta del detector frente a la concentración del compuesto ensayado. Para determinar la linealidad se ha medido el área y la altura de los picos cromatográficos para cada uno de los fenoles estudiados al menos a cinco niveles de concentraciones, dentro del rango esperable en las muestras biológicas reales. Cada medida se tomó por triplicado. Los resultados obtenidos para cada compuesto se muestran en las Tablas 37 y 38, donde se indica: rango de linealidad estudiado, ecuación de regresión lineal y coeficientes de regresión de cada compuesto.

Se observa, en general, buenas regresiones tanto para la altura como para el área en las concentraciones ensayadas en los dos detectores. La altura puede ser útil para cuantificar picos que no presenten buena resolución.

b) Límites de detección y cuantificación

El límite de detección (LDD) es la concentración de analito más baja que produce una respuesta del detector por encima del nivel de ruido del sistema. Suele tomarse como el valor tres veces superior a la línea de base del nivel de ruido.

El límite de cuantificación o de determinación (LDC) es la concentración de analito más baja que se puede medir con exactitud, y se toma frecuentemente como diez veces el nivel del ruido.

Ambos parámetros se han establecido numéricamente según el procedimiento de Miller y Miller (1993), tomando tres (LDD) y diez veces (LDC) respectivamente el valor de la relación existente entre la desviación estándar de la regresión y la pendiente de las rectas de calibrado.

$$\text{LDD} = 3 \sigma / b = 3 \text{ Sa}/b$$

$$\text{LDC} = 10 \sigma / b = 10 \text{ Sa}/b$$

Siendo “Sa” el error asociado a la ordenada en el origen y “b” la pendiente de la recta de calibrado ($y = bx + a$).

Se han calculado los límites de detección y cuantificación en ambos detectores, fotodiodos y fluorescencia, para cada uno de los compuestos fenólicos ensayados en función del área y de la altura de los picos cromatográficos. Por tanto, tenemos cuatro rectas de calibrado para los fenoles fluorescentes, y dos para los no fluorescentes. Las concentraciones de los fenoles con las que se han realizado las rectas de calibrado son las diluciones de la Disolución VI (Tablas 5 – 6).

Fenol		Intervalo	ec regresión	r	L.D.D.	L.D.C.
Gálico	Área	7.00-0.280	$y = 0.2737x - 0.0143$	0.99976	0.113	0.376
	Altura	2.800-0.289	$y = 14048x + 1594.8$	0.99829	0.191	0.637
Protocatéquico	Área	3.080-0.154	$y = 0.3734x - 0.0074$	0.99983	0.042	0.140
	Altura	3.080-0.154	$y = 24359x + 936.58$	0.99905	0.080	0.268
Cafeico	Área	2.850-0.114	$y = 0.5065x - 0.0124$	0.99983	0.040	0.132
	Altura	2.850-0.114	$y = 16988x - 389$	0.99911	0.088	0.293
Miricetina	Área	14.25-0.456	$y = 0.2319x - 0.036$	0.97729	4.287	14.29
	Altura	14.25-0.456	$y = 13326x - 10278$	0.99538	1.510	5.03
Morina	Área	2.825-0.565	$y = 0.1301x - 0.0374$	0.99924	0.157	0.523
	Altura	2.825-0.565	$y = 5805.4x - 1794$	0.99861	0.214	0.714
Quercetina	Área	2.825-1.695	$y = 1.6199x - 2.629$	0.99874	0.348	1.160
	Altura	2.825-1.695	$y = 75829x - 123000$	0.99954	0.210	0.701
Rutina	Área	0.600-0.090	$y = 0.225x + 0.0074$	0.99843	0.032	0.106
	Altura	1.500-0.090	$y = 13929x + 1258.9$	0.99853	0.055	0.185
Kaempferol	Área	0.600-0.060	$y = 0.7512x + 0.0050$	0.99501	0.071	0.236
	Altura	0.600-0.060	$y = 6280.7x - 136.4$	0.99831	0.031	0.105

Tabla 37. Linealidad de los Compuestos fenólicos no fluorescentes. Valores en mg/L.

Ecuaciones de regresión obtenidas con el detector de fotodiodo respecto al área del pico cromatográfico (A Fot) y respecto a la altura del pico (H fot). Rango de concentraciones, coeficiente de regresión ("r"), límites de detección (L.D.D.) y cuantificación (L.D.C.).

Compuesto	Detector	Rango	Ecuación regresión	r	L.D.D.	L.D.C.
Gentísico	A Fot	4.625-0.185	$y=0.1389x - 0.005$	0.99946	0.153	0.511
	H Fot	3.700-0.185	$y=5992.1x+18.18$	0.99875	0.184	0.615
	A Fluor	3.700-0.185	$y= 7.030x - 0.460$	0.99974	0.067	0.224
	H Fluor	3.700-0.185	$y= 0.271x - 0.002$	0.99993	0.047	0.158
Catequina	A Fot	4.625-0.370	$y= 0.0544x + 0.003$	0.9996	0.116	0.388
	H Fot	3.7 - 0.370	$y= 2325.2x + 4.003$	0.9996	0.103	0.342
	A Fluor	0.925-0.093	$y=48.396 x - 1.296$	0.9995	0.029	0.095
	H Fluor	0.740-0.093	$y=1.5458x - 0.0493$	0.99967	0.021	0.070
Vainíllico	A Fot	3.900-0.157	$y=0.402x - 0.006$	0.99991	0.029	0.097
	H Fot	3.900-0.157	$y=11463x - 60.86$	0.99931	0.106	0.352
	A Fluor	0.628-0.079	$y=81.668x- 1.718$	0.99995	0.007	0.022
	H Fluor	0.628-0.079	$y=1.754x- 0.0164$	0.99869	0.039	0.131
Epicatequina	A Fot	4.425-0.531	$y=0.061x+ .0056$	0.99945	0.134	0.447
	H Fot	4.425-0.531	$y=2459.9x+138.2$	0.99465	0.419	1.396
	A Fluor	0.708-0.089	$y=52.240x- 1.809$	0.99977	0.016	0.054
	H Fluor	0.708-0.089	$y=1.491x- 0.0432$	0.99984	0.016	0.052
Tirosol	A Fot	3.625-0.016	$y=0.053x+0.0004$	0.99955	0.082	0.273
	H Fot	2.900-0.435	$y=1865.2x-96.12$	0.99881	0.142	0.474
	A Fluor	0.580-0.073	$y=66.735x-0.6139$	0.99688	0.049	0.163
	H Fluor	0.580-0.073	$y=1.9617-0.0423$	0.98911	0.086	0.288
Ferúlico	A Fot	3.200-0.512	$y=0.5306+0.0624$	0.99986	0.051	0.172
	H Fot	3.200-0.512	$y=14928x+1154.2$	0.99967	0.073	0.244
	A Fluor	2.560-0.384	$y=2.0396+0.44886$	0.99970	0.077	0.257
	H Fluor	2.560-0.384	$y=62022x-4360$	0.99978	0.097	0.323
Cumárico	A Fot	3.275-0.395	$y=0.7924x+0.0976$	0.99981	0.049	0.163
	H Fot	3.275-0.131	$y=24640x+115.53$	0.99977	0.061	0.203
	A Fluor	2.620-0.262	$y=0.716-0.1972$	0.99325	0.373	1.243
	H Fluor	2.620-0.262	$y=18604x-3901$	0.99570	0.297	0.991
Resveratrol	A Fot	4.200-0.008	$y= 2.291x + 0.0011$	0.9992	0.145	0.483
	H Fot	4.200-0.008	$y=132318.6x-1043$	0.9990	0.168	0.559
	A Fluor	0.420-0.008	$y=34.015x - 0.3974$	0.9992	0.020	0.080
	H Fluor	0.420-0.008	$y=1.6428x+0.06347$	0.9990	0.033	0.111

Tabla 38. Linealidad de los Compuestos fenólicos fluorescentes. Valores en mg/L. Rango de concentraciones en el que se han establecido, coeficiente de regresión ("r") y límites de detección (L.D.D.) y cuantificación (L.D.C.). Ecuaciones de regresión obtenidas:

1. con el detector de fotodiodeo respecto al área del pico cromatográfico (A Fot) y respecto a la altura del pico (H fot).
2. con el detector de fluorescencia respecto al área del pico cromatográfico (A Fluor) y respecto a la altura del pico (H Fluor).

La fluorescencia ha sido descrita como una de las técnicas de detección más sensible (*Skoog y Leary, 1980*). Sin embargo, para los ocho compuestos fenólicos fluorescentes ensayados, las mejoras obtenidas para los límites de detección son como máximo de un orden de magnitud, y esto ocurre para el ácido gálico, la catequina, el ácido vainílico, la epicatequina y el resveratrol. Los resultados son muy similares a los obtenidos por otros autores (*Viñas et al., 2000*) e incluso mejores para el detector de fotodiodos. Hay autores que se decantan por la fluorescencia (*Carando et al., 1998; Ruidavets et al., 2000*), pero otros prefieren el detector de fotodiodos o bien conectar ambos detectores en serie (*Giachetti et al., 1999*). El obtener buenos límites de detección con el detector de fotodiodos presenta la ventaja de que permite la confirmación de los picos mediante la comparación espectral.

La detección con fotodiodos ha demostrado en numerosos estudios ser más sensible que la electroforesis capilar, que se suele emplear para la determinación de compuestos fenólicos en vinos (*Prasongsidh y Skurray, 1998; Chu et al., 1998*), o que el empleo de un detector electroquímico (*Donovan et al., 1999b*) y está en el mismo rango de detección de la detección mediante quimioluminiscencia (*Cui et al., 1999*).

c) Estudios de incertidumbre

Precisión o repetibilidad

La precisión del instrumento o repetibilidad se expresa como coeficiente de variación o desviación estándar relativa (RSD). Para evaluarla hemos realizado diez inyecciones sucesivas de la Disolución de patrones VI.7 y se han tomado datos tanto del detector de fotodiodos como del de fluorescencia.

En la Tabla 39 se ofrecen los valores obtenidos con el detector de fotodiodos obtenidas por inyecciones sucesivas de una disolución de patrones al medir el área de los picos. Como se puede observar, se han obtenido valores dentro de los límites de la AOAC para ácido gálico, tirosol, catequina, vainílico, ferúlico y quercetina. Los que peores valores dan son rutina y resveratrol.

Com-puesto	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Media	RSD
Gálico	0.695	0.744	0.837	0.725	0.851	0.837	0.696	0.771	0.747	0.778	0.768 + 0.058	7.5
Protocaté- guico	0.447	0.518	0.566	0.416	0.459	0.509	0.365	0.342	0.327	0.238	0.419 + 0.101	24.1
Tirosol	0.541	0.678	0.727	0.557	0.644	0.740	0.597	0.660	0.646	0.686	0.648 0.066	10.2
Catequina	0.706	0.740	0.774	0.666	0.736	0.825	0.647	0.667	0.763	0.629	0.715 + 0.063	8.8
Vainíllico	0.590	0.664	0.715	0.582	0.656	0.704	0.588	0.585	0.632	0.562	0.628 + 0.055	8.7
Cafeico	0.400	0.442	0.484	0.377	0.436	0.420	0.358	0.321	0.326	0.264	0.383 + 0.067	17.4
Epicatequi- na	0.636	0.706	1.077	0.565	0.624	0.735	0.542	0.538	0.609	0.529	0.656 + 0.164	24.9
Cumárico	0.403	0.373	0.481	0.357	0.366	0.365	0.341	0.261	0.277	0.160	0.338 + 0.088	25.9
Ferúlico	0.569	0.520	0.643	0.565	0.566	0.636	0.582	0.444	0.497	0.380	0.540 + 0.082	15.2
Rutina	0.258	0.114	0.284	0.196	0.131	0.290	0.294	0.060	0.048	0.035	0.171 + 0.106	62
Resveratrol	0.502	0.127	0.209	0.250	0.168	0.316	0.223	0.208	0.231	0.214	0.245 + 0.103	42
Morina	0.436	-	0.349	0.531	0.408	0.768	0.449	0.457	0.497	0.481	0.486 + 0.118	24.3
Quercetina	1.726	1.647	1.692	1.778	1.713	1.838	1.694	1.754	1.729	1.740	1.731 + 0.052	3

Tabla 39. Evaluación de la precisión del detector de fotodiodos. Concentraciones obtenidas al medir el área de los picos del fotodiodo (mg/L).

Los coeficientes obtenidos, están dentro de los admitidos por la *AOAC (1993)* para concentraciones próximas a los límites de cuantificación de los compuestos ensayados. Cuando la medida está próxima a los límites de detección la desviación estándar relativa aumenta. Si la disolución ensayada hubiera sido más concentrada, probablemente la precisión sería mejor. Sin embargo, se han elegido estas concentraciones porque se acercan a los niveles que cabe esperar en las muestras biológicas reales.

También realizamos un estudio de la precisión del instrumento al medir las alturas de los picos cromatográfico obtenidos con el detector de fotodiodos. Los datos recogidos se muestran en la Tabla 40.

Compuesto	1	2	3	4	5	6	Media	RSD
Gálico	0.695	0.725	0.771	0.778	0.432	0.851	0.709 ± 0.146	20.5
Protocatequico	0.447	0.416	0.342	0.238	0.166	0.459	0.345 ± 0.120	34.8
Tirosol	0.541	0.557	0.660	0.686	0.540	0.644	0.605 ± 0.066	10.9
Catequina	0.706	0.666	0.667	0.629	0.354	0.736	0.626 ± 0.138	22.1
Vainílico	0.590	0.582	0.585	0.562	0.314	0.656	0.548 ± 0.119	21.7
Cafeico	0.400	0.377	0.321	0.264	0.209	0.436	0.335 ± 0.086	25.8
Epicatequina	0.636	0.565	0.538	0.529	0.233	0.624	0.521 ± 0.148	28.4
Cumárico	0.403	0.357	0.261	0.160	0.060	0.366	0.309 ± 0.099	31.9
Ferúlico	0.569	0.565	0.444	0.380	-	0.566	0.505 ± 0.088	17.4
Rutina	0.258	0.196	0.060	0.035	-	0.131	0.136 ± 0.093	68.3
Resveratrol	0.502	0.250	0.208	0.214	-	0.168	0.268 ± 0.134	49.8
Morina	0.436	0.531	0.457	0.481	-	0.408	0.463 ± 0.047	10.1
Quercetina	1.726	1.778	1.754	1.740	-	1.713	1.742 ± 0.025	1.4

Tabla 43. Concentraciones obtenidas por inyecciones no sucesivas de una disolución de patrones al medir el área de los picos del fotodiodeo (mg/L).

Como era predecible, las desviaciones son mayores entre diferentes ensayos que en ensayos sucesivos.

d) Selectividad y resolución

Selectividad a menudo se usa como sinónimo de especificidad, pero son términos distintos. En cromatografía, la especificidad es la capacidad del método para medir con exactitud la respuesta de un analito en presencia de todos los posibles componentes de la muestra. La selectividad es la capacidad de un método de distinguir entre sí especies químicas diferentes dando respuestas distintas para cada una de ellas.

La selectividad dependerá de la matriz y de la presencia de compuestos interferentes, por lo que se calcula por separado para cada tipo de muestras.

Para determinar la selectividad del método propuesto se estableció como criterio que los picos cromatográficos correspondientes a cada fenol tuvieran una resolución de al menos 1.5 respecto a los demás picos del cromatograma (analitos y no analitos). La resolución de los picos de los compuestos fenólicos con los picos cromatográficos que aparecen antes y después se ha calculado con la fórmula (*Schoenmakers, 1988*):

$$Y = TR_2 - TR_1 / (W_2 + W_1) / 2.$$

Donde Y es la resolución entre dos picos, TR es el tiempo de retención de cada uno de los picos y W la medida de la anchura de la base del pico. Matemáticamente, W se calcula como la diferencia entre los puntos de intersección entre las tangentes a ambos lados del pico cromatográfico y la línea de base del cromatograma.

Resolución de los compuestos fenólicos en muestras de plasma

Se ha tomado una muestra de plasma a la que se han añadido patrones de fenoles en concentraciones conocidas mediante la adición de 0.1 mL/ mL de la Disolución III. Se ha realizado el análisis cromatográfico de dicha muestra de plasma adicionada de patrones, mediante inyección directa tras filtrarla con Anotop según el método ya descrito (*Roggero et al., 1991*).

Se obtuvo el cromatograma correspondiente gracias al detector de fotodiodos. Para cada compuesto se ha medido la resolución respecto al pico cromatográfico anterior (Y1) y al posterior (Y2). Los resultados obtenidos se ofrecen en la siguiente tabla (Tabla 44), donde T_R y W son los datos correspondientes al fenol en cuestión, T_{R0} y W_0 son los del pico cromatográfico anterior y T_{R2} y W_2 son los del pico posterior.

Como se puede comprobar, todos los valores obtenidos son excelentes, salvo para el tirosol con el pico posterior. No obstante esto no dificulta su identificación por comparación espectral, y la cuantificación puede hacerse en base a la altura del pico.

Compuesto	T _R	T _{R0}	T _{R2}	W	W0	W2	Y1	Y2
Gálico	16.320	13.733	17.470	60	75	15	3.83	3.07
Protocatéquico	24.019	23.082	26.499	30	45	60	2.50	5.51
Tirosol	33.914	30.436	33.970	45	75	15	5.80	0.19
Catequina	39.436	33.970	41.714	45	15	120	2.73	2.76
Vainíllico	48.245	41.622	52.085	75	165	75	5.52	5.12
Cafeico	52.069	48.353	58.943	60	90	75	4.95	10.18
Epicatequina	67.850	66.487	70.195	30	45	60	3.63	5.21
Cumárico	74.390	70.282	81.607	90	60	60	5.48	9.62
Ferúlico	92.656	74.934	104.639	120	135	225	13.90	6.95
Rutina	109.936	108.527	111.825	60	15	15	3.76	5.04
Resveratrol	118.832	117.960	120.717	45	15	15	2.91	6.28
Morina	123.109	121.028	127.810	60	15	45	5.55	8.95
Quercetina	130.011	127.810	141.418	60	15	15	5.87	30.42
Kaempferol	142.806	130.010	144.212	30	195	15	11.37	6.25

Tabla 44. Resoluciones de los fenoles en plasma humano. T_R y W son los datos correspondientes al fenol en cuestión, T_{R0} y W0 son los del pico cromatográfico anterior y T_{R2} y W2 son los del pico posterior.

Resolución de los compuestos fenólicos en muestras de orina

Una muestra de orina se adiciona con 0.1 mL la Disolución patrón IV. La muestra así adicionada de patrones se filtra y se inyecta en el cromatógrafo. El gradiente que se emplea con esta finalidad ha sido descrito para la determinación de resveratrol y compuestos relacionados en vinos (Roggero y Archier, 1994) tal como se refiere en el capítulo de *Material y Métodos* de la presente Memoria.

Tal como se recoge en la siguiente tabla se consiguen buenas resoluciones para los ácidos p-cumárico y ferúlico, el estilbeno resveratrol y los flavonoides rutina, morina, quercetina y kaempferol.

Fenol	TR	TR0	TR2	W	W0	W2	Y1	Y2
Cumárico	25.5	23.6	27.9	0.75	1	0.75	2.2	3.2
Ferúlico	28.9	27.9	30.4	0.75	0.75	0.75	1.3	2.0
Rutina	32.9	31.9	33.7	0.5	0.25	0.25	2.7	2.1
Resveratrol	40.7	39.4	42.6	0.5	0.25	0.5	3.5	3.8
Morina	43.9	42.6	46.2	0.75	0.5	1.5	2.1	2.0
Quercetina	50.4	48.5	62.8	1.25	0.75	1	1.9	11.0
Kaempferol	62.8	50.4	-	1	1.75	-	11.0	-

Tabla 45. Resoluciones de los fenoles en orina humana, donde TR y W son los datos correspondientes al fenol en cuestión, TR0 y W0 son los del pico cromatográfico anterior y TR2 y W2 son los del pico posterior.

Donde TR es el tiempo de retención del compuesto, siendo TR0 y TR2 los tiempos de retención de los picos cromatográficos anterior y posterior respectivamente. W es la anchura en la base del compuesto en cuestión, siendo W0 y W2 la anchura en la base de los picos cromatográficos anterior y posterior respectivamente

Como se puede comprobar, los siete compuestos fenólicos tienen buenas resoluciones en muestras de orina con el gradiente empleado. La pureza de los picos así obtenidos se muestra en la siguiente tabla:

e) Test de pureza de los picos

Para evaluar la pureza espectral de un pico cromatográfico tenemos dos valores que son:

Purity angle: es el promedio ponderado de todos los espectros de un pico comparado con el espectro en el punto de máxima señal del componente. Es una medida de la homogeneidad espectral.

Purity threshold: es la suma del ángulo de pureza debido a el ruido y el ángulo de pureza del solvente. Este es el mayor ángulo de pureza que no puede ser atribuido a diferencias espectrales entre dos componentes.

En general si el Purity angle es mayor que el Purity threshold, el pico no es homogéneo. Hemos medido la pureza de los compuestos fenólicos al ser incorporados a una matriz de suero y realizar la inyección directa de la misma, los resultados para cada parámetro se muestran en la siguiente tabla:

Pureza de los compuestos fenólicos en muestras de plasma

Se ha tomado una muestra de plasma a la que se han añadido patrones de fenoles en concentraciones conocidas mediante la adición de 0.1 mL/ mL de la Disolución III. Se ha realizado el análisis cromatográfico de dicha muestra de plasma adicionada de patrones, mediante inyección directa tras filtrarla con Anotop según el método ya descrito (Roggero *et al.*, 1991).

Compuesto	Purity angle	Purity threshold
Gálico	0.228	0.399
Protocatéquico	0.040	0.244
Tirosol	0.413	0.540
Catequina	0.474	0.673
Vainíllico	0.100	0.266
Cafeico	0.297	0.218
Epicatequina	0.362	0.687
p-cumárico	0.028	0.226
Ferúlico	0.214	0.289
Rutina	0.158	0.305
Resveratrol	0.170	0.234
Morina	2.657	1.154
Quercetina	2.217	0.851

Tabla 46. Test de pureza de los picos en una muestra de plasma humano.

Pureza de los compuestos fenólicos en muestras de orina

Una muestra de orina se adiciona con 0.1 mL la Disolución patrón IV. La muestra así adicionada de patrones se filtra y se inyecta en el cromatógrafo. El gradiente que se emplea con esta finalidad ha sido descrito para la determinación de resveratrol y compuestos relacionados en vinos (*Roggero y Archier, 1994*) tal como se refiere en el capítulo de *Material y Métodos* de la presente Memoria.

Como se puede comprobar, los siete compuestos fenólicos tienen buenas resoluciones en muestras de orina con el gradiente empleado. La pureza de los picos así obtenidos se muestra en la siguiente tabla:

Compuesto	Purity angle	Purity threshold
p-Cumárico	0.183	0.239
Ferúlico	0.194	0.223
Rutina	0.410	0.252
Resveratrol	0.100	0.223
Morina	0.471	0.319
Quercetina	0.143	0.225
Kaempferol	0.332	0.252

Tabla 47. Pureza de los picos en muestra de orina humana.

f) Recuperación

La exactitud del método se evaluó a partir de los ensayos de recuperación. La recuperación esperada depende de la matriz de la muestra, del proceso de manipulación de la muestra y de la concentración de analito. El manual para la verificación de métodos de la AOAC estima que la recuperación para concentraciones entre 1 y 10 ppm debe encontrarse entre un 80 y un 110 %.

Para evaluar la interacción de la matriz con los fenoles, las recuperaciones (R) se han calculado en este caso por comparación con las ecuaciones de calibrado externo realizadas previamente para cada compuesto fenólico a partir de una disolución de patrones en idénticas concentraciones. La recuperación así obtenida se expresa:

$$R = \frac{b_{AP}}{b_{CE} \times 100}$$

Donde b_{CE} es el valor de la pendiente de la ecuación de adición de patrón al plasma y b_{EC} corresponde a la pendiente de la recta de calibrado externo.

Estudios de Recuperación en Plasma

De una muestra de plasma acondicionada se tomaron cuatro alícuotas. A cada una se le realizó la adición de patrón con 10 μ L de una disolución concentrada del conjunto de fenoles en estudio (concentraciones IV.1, IV.2, IV.3 y IV.4). Cada alícuota se analizó por duplicado. Con los valores obtenidos se obtuvo para cada fenol la correspondiente ecuación de adición de patrón, que fue calculada con cuatro puntos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 48.

Como se puede observar en la Tabla, los flavonoides y el resveratrol muestran una gran interacción con la matriz, siendo muy bajos los valores de recuperación obtenidos para estos compuestos.

Los fenoles que tienen recuperaciones más altas son los ácidos cafeico y ferúlico.

Compuesto	Rango (mg/L)	r	Ecuación MOSA	R
Gálico	10.9 – 1.1	0.965	$y = 0.17117x + 0.16002$	79.8
Protocatéquico	16.1 – 1.6	0.999	$y = 0.27449x - 0.1029$	70.3
Tirosol	32.4 – 3.2	0.984	$y = 0.0669x - 0.2516$	65.5
Catequina	9.8 – 0.9	0.980	$y = 0.01809x + 0.09122$	43.7
Vainílico	11.1 – 1.1	0.976	$y = 0.2387x + 0.13306$	76.5
Cafeico	12.8 – 1.3	0.977	$y = 0.43239x + 0.41$	98.4
Epicatequina	16.7 – 1.7	0.997	$y = 0.0861x - 0.13$	124
Cumárico	23.7 – 2.4	0.979	$y = 0.62935x + 1.592$	73.1
Ferúlico	14.0 – 1.4	0.999	$y = 0.48645x + 0.00835$	90.1
Rutina	11.0 – 1.1	0.999	$y = 0.13078x - 0.0109$	65.3
Resveratrol	7.8 – 0.8	0.999	$y = 0.66029 + 0.03629$	35.8
Morina	12.8 – 1.3	0.983	$y = 0.04536x - 0.107$	20.1
Quercetina	19.3 – 1.9	0.999	$y = 0.27752x - 0.1067$	30.0
Kaempferol	10.5 – 1.1	1.000	$y = 0.28126x - 0.1492$	32.9

Tabla 48. Ecuaciones de adición de patrón de los fenoles en plasma humano.
R = Recuperaciones calculadas por la pendiente de la recta

Estudios de Recuperación en Orina

Se ha realizado la adición de patrón a cuatro niveles de concentración a sendas alícuotas de una misma muestra de orina libre de compuestos fenólicos. Se procedió a la filtración e inyección directa de las mismas en el cromatógrafo, y con la medida obtenida con el detector de fotodiodos se calculó para cada compuesto la correspondiente recta de adición de patrón (MOSA) y la recuperación respecto a las mismas concentraciones con el calibrado externo, $R = b_{MOSA} / b_{EC}$, de la misma forma que se hizo con el plasma. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

En general, se puede decir que salvo para la morina, las recuperaciones de los fenoles son buenas. También es la morina el fenol que aparece menos puro. Estos resultados se traducen en la posibilidad de cuantificar los fenoles por cali-

brado externo, a diferencia de las muestras de plasma en las que hay una fuerte interacción con la matriz.

No obstante, los tratamientos pueden ser de utilidad para concentrar los analitos.

Compuesto	C (mg/L)	Ecuación MOSA	r	R (%)
p-cumárico	23.7 – 2.4	$y = 1.0474x - 0.8624$	0.998	120
Ferúlico	14.0 – 1.4	$y = 0.58744x - 0.1581$	0.994	108.8
Rutina	11.0 – 1.1	$y = 0.17569x + 0.02563$	0.997	87.7
Resveratrol	7.8 – 0.8	$y = 1.6199x + 0.4738$	0.999	87.8
Morina	12.8 – 1.3	$y = 0.08147x - 0.148$	0.995	36
Quercetina	19.3 – 1.9	$y = 0.8234x + 0.19836$	0.997	89.2
Kaempferol	10.5 – 1.1	$y = 0.8234x + 0.19836$	0.996	87.9

Tabla 49. Ecuaciones de adición de patrón de los fenoles en orina.

R = Recuperaciones calculadas por la pendiente de la recta

5. 3. 3. Estudio de los Factores que Influyen en la Estabilidad de los Fenoles en Plasma Humano

Durante la puesta a punto del método de análisis, se ha observado que algunos compuestos fenólicos presentan problemas de recuperación, por lo que se ha creído conveniente realizar un estudio separado de aquellas condiciones que pudieran afectar a su medida, así como proponer tratamientos conducentes a mejorar las determinaciones.

Por ello, se ha ensayado la posible influencia de una serie de factores como son:

- a) Estudio de la influencia de la temperatura
- b) Estudio de la influencia del pH
- c) Estudio de la influencia del pH y la temperatura fisiológica
- d) Adición de anticoagulantes
- e) Empleo de un antioxidante
- f) Efecto de las proteínas plasmáticas
- g) Inhibición de la actividad enzimática del plasma

Todas las medidas cromatográficas del presente capítulo se ha realizado atendiendo a las condiciones descritas en *Material y Métodos*.

a) Estudio de la influencia de la temperatura

El efecto de la temperatura sobre los compuestos fenólicos se ha probado a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) y a -20°C. En ambos casos se procede de la misma manera como se detalla a continuación.

A una muestra de plasma se le añade un pequeño volumen de una disolución muy concentrada (Disolución patrón III) de todos los patrones en estudio, con el fin de que el efecto de aumento de volumen no sea significativo (Tabla 50). Se realiza el análisis con la técnica de inyección directa antes y después de dejar la muestra incubada dos días a temperatura ambiente.

Compuesto	tiempo 0 (mg/L)	48 horas (mg/L)	% E
Gálico	0.696	-	-
Protocatéquico	5.113	3.837	75
Tirosol	4.591	5.413	117.9
Catequina	0.771	-	-
Vainílico	5.116	5.072	99.1
Cafeico	5.232	0.177	3.4
Epicatequina	1.593	-	-
Cumárico	8.528	7.103	83.3
Ferúlico	5.943	4.235	71.3
Rutina	5.179	0.139	2.7
Resveratrol	2.035	0.090	4.4
Morina	3.152	-	-
Quercetina	2.373	-	-

Tabla 50. Concentraciones encontradas (mg/L) y porcentaje encontrado (%E) de compuestos fenólicos en una muestra de plasma fortificada e incubada a temperatura ambiente durante 48 horas.

Se observa que no se pueden detectar una serie de compuestos que son: ácido gálico, catequina, epicatequina, morina y quercetina. De otros tres compuestos, ácido cafeico, rutina y resveratrol, tan sólo se mide una cantidad inferior al 5% de la concentración inicial. Los valores encontrados son superiores a un 70% para: ácido protocatéutico, tirosol, y los ácidos vainílico, cumárico y ferúlico.

De forma análoga, se analizó otra muestra de plasma con adición de compuestos fenólicos. Transcurridos veinte días, la muestra, que se había mantenido a -20°C , se descongeló y se volvió a analizar. Los resultados de ambos análisis se muestran en la siguiente Tabla:

Compuesto	tiempo 0 (mg/L)	día 20 (mg/L)	% E
Gálico	3.468	0.515	14.9
Á. Protocatéutico	10.444	9.861	94.4
Tirosol	16.602	11.492	69.2
Catequina	11.833	1.849	15.6
A. Vainílico	10.205	10.256	100.5
A. Cafeico	9.932	9.890	99.6
Epicatequina	10.313	1.707	16.6
A. Cumárico	16.801	16.501	98.2
A. Ferúlico	11.874	11.017	92.8
Rutina	11.050	6.336	57.3
Resveratrol	4.231	3.770	89.1
Morina	8.950	5.060	56.5
Quercetina	3.583	3.181	88.8

Tabla 51. Concentraciones (mg/L) y porcentajes encontrados (%E) de compuestos fenólicos en una muestra de plasma fortificada y congelada durante 20 días.

En todos los casos se puede ver que los valores encontrados son superiores respecto a la incubación a temperatura ambiente, a pesar de que el tiempo transcurrido ha sido más prolongado (Tablas 50 y 51).

También es de destacar que se obtienen valores similares para compuestos con estructura química relacionada. Así, los tres derivados hidroxicinámicos, cafeico, ferúlico y cumárico, presentan valores altos y muy parecidos entre sí (99.6, 98.2 y 92.8% respectivamente).

Como se puede observar, los fenoles derivados del ácido benzoico (protocatequico y vainílico) son bastante estables excepto en el caso del ácido gálico, que es el que tiene más sustituyentes hidroxilos. Se ha visto que al realizar la adición de patrón al suero el ácido gálico da un pico bastante achatado y con un hombro. Sin embargo, al realizar el test de pureza se comprueba que este pico es puro. Este hecho se podría explicar porque a pH ácido el ácido gálico no está ionizado y existe en una única forma, mientras que a pH neutro o básico existe un equilibrio entre las formas ionizadas y no ionizadas que se traducen en un ensanchamiento del pico.

En general, los flavonoides son los que presentan mayor inestabilidad, sobre todo los flavan-3-ol (catequina y epicatequina) que sufren un descenso importante en su concentración (15.6 y 16.6% respectivamente).

Puesto que se ha descrito una inestabilidad de los fenoles en el plasma, mayor cuanto mayor es la temperatura, es de suponer que en este medio se produce alguna reacción química entre los fenoles y alguna sustancia presente en el propio plasma.

b) Estudio de la influencia del pH

El efecto del pH se estudió aisladamente. Para ello, se preparó una única disolución hidroalcohólica que contenía todos los patrones a concentraciones conocidas, tomando 0.1 mL de la Disolución IV por cada 3 mL de disolvente. La disolución se realiza en tampón de fosfato sódico monopotásico para mantener el pH a 7.4 (*Official Methods of Analysis, 1970*). Se realiza el análisis cromatográfico de dicha disolución recién preparada, a las 24 horas, a las 48 y a las 52 horas. Durante los días en que tuvieron lugar los análisis la disolución se mantuvo a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente Tabla (Tabla 52):

Compuesto	Inicial (mg/L)	24h (mg/L)	% E	C 48h (mg/L)	%E 48h	C 52 h (mg/L)	% E
Gálico	11.5	5.0	43	1.5	13	-	0
Protocatequico	17.0	17.7	104	18.1	106	18.2	107
Tirosol	34.3			37.4	109	37.9	110
Catequina	10.3	4.5	44	1.4	14	-	0
Vainílico	11.7	10.9	88	10.3	88	10.8	92
Cafeico	13.5	9.2	68	6.2	46	4.7	35
Epicatequina	17.7	7.2	41	3.1	18	-	0
Cumárico	25.0	22.0	88	21.7	87	23.0	92
Ferúlico	14.8	14.2	96	13.0	88	13.4	91
Rutina	11.7	15.3	131	13.3	114	10.4	89
Resveratrol	8.3	4.1	49	3.6	43	1.5	18
Morina	13.2	5.6	42	5.1	39	3.5	27
Quercetina	20.4	4.4	22	-	0	-	0
kaempferol	11.1	0.9	8	-	0	-	0

Tabla 52. Evolución de una disolución de patrones a pH 7.4 durante tres días a T^a ambiente.

En primer lugar, se puede observar que las concentraciones de ciertos fenoles se mantienen superiores a un 87 % después de tres días; estos son: ácido protocaté- quico, tirosol, ácido vainílico, ácido cumárico, ácido ferúlico y rutina. Todos ellos, excepto la rutina, presentaban valores por encima del 70 % respecto al valor inicial cuando eran incubados en plasma a temperatura ambiente durante dos días (Tabla 50).

Para los demás fenoles, las concentraciones disminuyen conforme aumenta el tiempo transcurrido. Si comparamos los valores obtenidos a las 48 horas con los que se obtuvieron en las mismas condiciones para una muestra de plasma con adición de patrones (Tabla 50), se puede comprobar que son adecuadas y similares para tirosol, ácido vainílico y ácido cumárico (por encima del 80%) y también que en ambos casos es nula la cantidad encontrada de quercetina.

Los compuestos que en plasma no se pudieron determinar a las 24 horas: ácido gálico, catequina, epicatequina, (Tabla 50), presentan la misma tendencia en la disolución patrón aunque requieran algo más de tiempo. Podemos destacar de estos resultados que a las 24 horas el ácido gálico da un pico achatado y con un hombro, pero puro. El área de este compuesto disminuye claramente con el tiempo.

Como conclusión se puede afirmar que, independientemente de otros factores, el pH es un factor a tener en cuenta para la determinación en plasma de los compuestos fenólicos, utilizando el método propuesto.

c) Estudio de la influencia del pH y la temperatura fisiológica

Cuando una persona ingiere compuestos fenólicos en su dieta o como suplemento, en caso de que sean absorbidos, pasan a la circulación sanguínea donde se encuentran a pH 7.4 y a una temperatura de 37°C. Si se pretende hacer un seguimiento de los fenoles, habrá que realizar extracciones de sangre al menos a la media hora de la ingesta para dar tiempo a la absorción. Se ha descrito que las concentraciones plasmáticas máximas de estos compuestos se consiguen en menos de dos horas desde la ingesta (*Donovan et al., 1999a; Yang et al., 1998*).

En este apartado, se intenta reproducir la influencia conjunta de dos factores: pH y temperatura fisiológicos, sobre la estabilidad de los compuestos fenólicos. Para ello, se prepara una disolución tampón con todos los patrones de los compuestos fenólicos en concentraciones conocidas. Se incuban a 37°C y se miden las concentraciones de cada fenol a tres tiempos: media hora, una hora y dos horas. Para cada compuesto se calcula el porcentaje que se encuentra respecto a la concentración inicial (% E). Los datos se ofrecen en la siguiente Tabla 53.

A la media hora de incubación, los porcentajes encontrados oscilaron entre un 80 y un 110 % para todos los compuestos, excepto para los flavonoides morina, queretina y kaempferol que son menores. Esto supone una dificultad para la determinación de estos compuestos en plasma aún cuando la extracción se realice a la media hora de la absorción.

Compuesto	C _i (mg/L)	%E ½ hora	% E 1 hora	% E 2 hora
Gálico	11.5	98	36	3.8
A. Protocatéquico	17.0	94	102	115
Tirosol	34.3	108	116	124
Catequina	10.3	100	77	49
A. Vainíllico	11.7	102	102	114
A. Cafeico	13.5	88	40	57
Epicatequina	17.7	91	52	22
A. Cumárico	25.0	90	93	105
A. Ferúlico	14.8	84	83	92
Rutina	11.7	104	102	105
Resveratrol	8.3	83	77	71
Morina	13.2	41	27	21
Quercetina	20.4	6	0.2	0.1
Kaempferol	11.1	62	10	0

Tabla 53. Evolución de los compuestos fenólicos a temperatura y pH fisiológicos.
%E: porcentaje encontrado en cada caso respecto a la concentración inicial

Transcurrida una hora de incubación hay numerosos compuestos que no alcanzan los valores del 80%, como se aprecia en la Tabla 36, y al cabo de las dos horas los resultados empeoran considerablemente.

Por lo cual, habrá que considerar la degradación sufrida debida al efecto de la temperatura y el pH en los estudios de cinética, distribución y curva de niveles plasmáticos.

También se han podido observar la aparición de nuevos picos con espectros de absorción similares al cafeico, y tiempo de retención coincidente con el cafeato de etilo.

Dado que una etapa frecuente en muchos tratamientos de muestra consiste en una acidificación para mejorar las condiciones de medida (*Morand et al., 1998; Giachetti et al., 1999; Ruiz-Gutiérrez et al., 2000*), se ha procedido a acidificar para ver si así se pudieran paliar las pérdidas producidas. Un mL de la misma disolución patrón incubada dos horas, se acidifica con 10 μ L de ácido o-fosfórico y se agita en baño de ultrasonidos durante quince minutos. Los valores así obtenidos son idénticos a los anteriores, por lo que este procedimiento no permite revertir la degradación sufrida por los compuestos fenólicos.

Como conclusión se debe admitir que al cuantificar los fenoles presentes en el plasma habrá que contar con un cierto porcentaje de pérdida en función del tiempo transcurrido desde su absorción hasta la extracción de sangre. Una vez realizada la toma de muestra y obtenido el plasma este deberá mantenerse en frío hasta que se realice el análisis lo antes posible.

d) Adición de los anticoagulantes

Cuando se realiza la extracción de sangre, ésta se recoge en un vacutainer que contiene un anticoagulante para evitar la coagulación. Por ello, se ha considerado interesante estudiar si el tipo de anticoagulante empleado tras la extracción de sangre pudiera afectar a la determinación de los compuestos fenólicos.

Con este fin, se procede a preparar disoluciones que contienen un único compuesto fenólico y se han ensayado aquellos cuyas pérdidas fueron más acusadas en el estudio de temperatura: ácido gálico, catequina y epicatequina. También se estudian resveratrol y quercetina, por su particular relevancia como antioxidantes en el vino. Los anticoagulantes que se ensayan son los de uso más frecuente: etilendiaminotetracético (EDTA) y heparina.

Para cada compuesto se preparan tres disoluciones tamponadas (pH=7.4) de fosfatosódico monopotásico (*Official Methods of Analysis, 1970*), las tres tienen idéntica concentración de patrón, pero una no lleva anticoagulante, otra lleva heparina y la tercera lleva EDTA.

Compuesto	Inicial (mg/L)	24h (mg/L)	% E	48h (mg/L)	% E
Ácido gálico	9.8	-	-	-	-
Ácido gálico-heparina	9.8	-	-	-	-
Ácido gálico-EDTA	9.8	-	-	-	-
Catequina	11.7	11.4	97	6.0	57
Catequina-heparina	11.7	10.4	89	7.9	81
Catequina-EDTA	11.7	10.5	90	7.8	80
Epicatequina	11.3	11.8	104	10.4	92
Epicatequina-heparina	11.3	9.8	87	9.7	86
Epicatequina-EDTA	11.3	12.5	111	11.4	101
Resveratrol	15.3	13.1	86	4.8	31
Resveratrol -heparina	15.3	14.9	97	7.0	46
Resveratrol -EDTA	15.3	15.3	100	6.1	40
Quercetina	10.0	2.2	22	1.6	16
Quercetina -heparina	10.0	2.2	22	0.0	0
Quercetina -EDTA	10.0	1.9	19	0.0	0

Tabla 54. Concentraciones (mg/L) de los fenoles estudiados en tres disoluciones.
%E: porcentaje encontrado en cada caso respecto a la concentración inicial

Durante el tiempo que duró el ensayo (48 horas) las disoluciones se mantuvieron a temperatura ambiente. Los resultados de las medidas realizadas a cada compuesto a las 24 y a las 48 horas se recogen en la Tabla, donde cada caso se expresa también como porcentajes encontrados respecto a la concentración inicial (% E).

Ácido gálico

La disolución patrón de ácido gálico (pH 7.4) comienza dando un pico cromatográfico similar al de la misma concentración sin tampón. Sin embargo, el área del pico disminuye en sucesivos análisis y al día siguiente ha desaparecido. Tampoco

dan señal las preparaciones de gálico con EDTA y con heparina transcurridas 24 horas.

Se procede a acidificar la disolución de gálico con HCl hasta pH 1, después de lo cual no se observa ninguna señal cromatográfica. También acidificamos las preparaciones con EDTA y heparina, pero tampoco se consigue recuperar la señal del ácido gálico.

En conclusión, a pH 7.4 se afecta la medida del ácido gálico, pues la señal del fotodiodo desaparece y no es posible identificarlo. Se observa el mismo efecto con anticoagulantes y sin ellos.

Catequina

Se observa una disminución en la concentración de catequina de un 43% cuando ésta se incubaba a pH 7.4 durante 48 horas. En las primeras 24 horas no se aprecia este efecto. Los anticoagulantes parecen mejorar la medida, pues, en ambos casos sólo se pierde un 20 %. Esto hace pensar que el pH es causante de parte de la inestabilidad observada, con independencia de otras variables que puedan influir. Además, como en iguales condiciones de temperatura y tiempo, para una muestra de plasma se obtuvieron descensos mayores, es de suponer que intervienen otros factores que aumentan la inestabilidad de la catequina.

Epicatequina

En ninguno de los casos, ni en la incubación a pH fisiológico ni con los anticoagulantes se observan variaciones significativas en la concentración de epicatequina, aunque quizás en el caso de utilizar heparina la estabilidad sea menor. Por esto, para la epicatequina, ni el pH ni los anticoagulantes pueden explicar los resultados que se obtuvieron en el plasma en similares condiciones.

Resveratrol

Se puede observar cómo en los tres casos el resveratrol permanece estable durante 24 horas, aunque sus niveles disminuyen de forma notable al segundo día. Esta disminución es, si cabe, más marcada cuando el resveratrol se incubaba sin anticoagu-

lante, por lo que se puede decir que tanto el pH como la temperatura ambiente pueden explicar la pérdida de resveratrol en un 70%.

Tanto para la catequina como para el resveratrol se obtienen mejores resultados cuando se incuban con un anticoagulante, ya sea EDTA o heparina.

Quercetina

Al igual que ocurrió con la muestra de plasma se observa una drástica desaparición de la quercetina, ya que, en los tres casos, en 24 h disminuye en torno a un 80% respecto la cantidad inicial. Pasadas 48 horas, las cantidades encontradas son ya muy bajas.

En resumen, el tipo de anticoagulante empleado no afecta a los resultados para estos compuestos. Para catequina, epicatequina y resveratrol, los valores encontrados a las 48 horas son superiores a los obtenidos con el plasma en iguales condiciones, por lo que hay que pensar en otros factores plasmáticos.

e) Empleo de un antioxidante

Los compuestos fenólicos son conocidos como eficaces antioxidantes (*Frankel et al., 1995*). Este hecho implica que ellos se oxidan con facilidad, por lo que se puede pensar que las pérdidas que se han observado en los mismos al ser añadidos al plasma pueden deberse también a su papel como antioxidantes biológicos. De hecho, este es el principal mecanismo de acción que puede explicar los efectos beneficiosos de su aporte en la dieta (*Frankel et al., 1998; Teissedre et al., 1996*).

Para mejorar la estabilidad de los fenoles en el plasma, una vez extraída la muestra de sangre, se ha empleado el ácido ascórbico (*Ruiz-Gutiérrez et al., 2000*). Así pues, para estudiar cómo puede beneficiar el empleo del antioxidante se preparan tres disoluciones de compuestos fenólicos a igual concentración (Disolución IV.1) con las siguientes características en cuanto a pH:

- a) disolución tampón, pH 7.4
- b) disolución tampón acidificada con 10 µl/ml ácido o-fosfórico (pH = 1.9)

- c) disolución tampón acidificada con 10 µl/ml ácido o-fosfórico (pH = 1.9) y con un 1% de ácido ascórbico como antioxidante.

Las tres disoluciones se mantuvieron refrigeradas durante cuatro días entre 0–4°C. Después de este tiempo de incubación se procedió al análisis de las mismas. Los resultados se muestran en la Tabla 55.

Compuesto	Inicial (mg/L)	pH 7.4		pH 1.9		pH 1.9 + AA	
		(mg/L)	%E	(mg/L)	%E	(mg/L)	%E
Gálico	11.5	3.6	31	5.5	48	9.9	86
A. Protocatéquico	17.0	13.3	78	19.7	116	17.9	105
Tirosol	34.3	24.5	71	40.5	118	33.3	97
Catequina	10.3	3.3	32	4.8	47	9.8	95
A. Vainillico	11.7	7.6	65	13.4	115	11.6	99
A. Cafeico	13.5	6.2	46	10.0	74	13.6	101
Epicatequina	17.7	5.4	31	7.7	44	13.7	77
A. Cumárico	25.0	16.6	66	23.8	95	26.1	104
A. Ferúlico	14.8	9.8	66	15.8	107	17.7	120
Rutina	11.7	11.2	96	17.0	145	13.9	119
Resveratrol	8.3	3.5	42	6.1	73	8.3	100
Morina	13.2	5.1	39	8.1	61	15.9	120
Quercetina	20.4	4.4	22	5.1	25	5.8	28
kaempferol	11.1	-	0	1.8	16	0.3	0

Tabla 55. Evolución de tres disoluciones de patrones en cuatro días de incubación (0–4°C), a pH 7.4, pH 1.9 y pH 1.9 con adición de 1% de ácido ascórbico (pH 1.9 + AA).

%E: porcentaje medido respecto a la concentración inicial (Ci).

Tras la realización de este ensayo se confirma que a pH ácido se obtienen mejores resultados. También se comprueba que la presencia del antioxidante (ácido ascórbico al 1%), estabiliza a la mayoría de los compuestos, como: ácido gálico, áci-

do protocatéquico, tirosol, catequina, ácido vainílico, ácido cafeico, ácido cumárico y resveratrol.

f) Efecto de las proteínas plasmáticas

Para estudiar el efecto de las proteínas plasmáticas en la determinación de compuestos fenólicos se realizan dos experimentos de adición de patrón a una muestra de plasma, efectuando la desproteínización con tricloroacético en un caso antes y en el otro después de dicha adición tal como se indica a continuación:

La muestra de plasma, acondicionada con 10 μ L ácido o-fosfórico y un 1% de ácido ascórbico según las condiciones ya establecidas.

- Experimento 1: 1 mL de plasma acondicionado + 10 μ L Disolución IV + desproteínización \rightarrow R1
- Experimento 2: 1 mL de plasma acondicionado + desproteínización + 10 μ L Disolución IV \rightarrow R2

Una vez realizada la determinación mediante cromatografía líquida, las concentraciones finales de los compuestos fenólicos se expresan como recuperaciones. Las recuperaciones se calculan para cada fenol en ambos ensayos (R1 y R2) respecto a la señal que emite el correspondiente patrón en un disolvente puro a la misma concentración (AOAC, 1993). Podemos comparar las recuperaciones obtenidas, para un mismo nivel de concentración, en ambos casos (Tabla 56). Si ambas recuperaciones son similares podremos decir que ni las proteínas ni el tratamiento de desproteínización interfieren en la determinación de los fenoles en el plasma. Por el contrario, si son recuperaciones diferentes hay dos casos posibles:

Si $R2 > R1$, la recuperación es mayor cuando la adición de patrones se realiza después de desproteínizar, ya que se evita la unión de los fenoles a las proteínas.

Si $R1 > R2$, a estos compuestos no les afecta el tratamiento de desproteínización y no precipitan junto con las proteínas.

Compuesto	C (mg/L)	R1(%)	R2(%)
Gálico	7.0	95	83
Protocatequico	10.4	79	84
Tirosol	20.9	99	89
Catequina	6.3	53	55
Vainílico	7.1	79	90
Cafeico	8.2	74	96
Epicatequina	10.7	60	78
Cumárico	15.2	58	87
Ferúlico	9.0	62	88
Rutina	7.1	51	65
Resveratrol	5.0	6.4	44
Morina	8.0	2.9	21
Quercetina	12.4	1.4	22
Kaempferol	6.6	1.2	19

Tabla 56. Adición de patrones a una muestra de plasma antes (R1) y después (R2) de la desproteinización.

La recuperación de la mayoría de los compuestos fenólicos, desde vainílico a kaempferol, es superior cuando se desproteiniza el plasma antes de la adición de patrones (R2). Al eliminar las proteínas plasmáticas se están evitando importantes interferencias en la determinación de estos compuestos.

Sin embargo, el ácido gálico y el tirosol muestran una tendencia inversa. Cuando la adición se hace antes de la desproteinización las recuperaciones son superiores (R1). No obstante, en ambos casos para los dos compuestos se obtienen buenas recuperaciones, superiores al límite del 80% establecido por la AOAC.

Curiosamente, las recuperaciones obtenidas para la catequina son iguales con ambos procedimientos, lo que supone que no es la interacción con proteínas la única causa de los bajos valores de recuperación para este compuesto.

g) Inhibición de la actividad enzimática del plasma

El plasma contiene enzimas hidrolasas, que reciben diferentes nombres, como esterasas, amidasas, peptidasas... (Flores *et al.*, 1992). También las globulinas, proteínas plasmáticas relacionadas con los procesos inmunológicos, poseen actividad enzimática (Guyton y Hall, 1997).

Para comprobar si las enzimas presentes en el plasma ejercen algún efecto sobre los compuestos fenólicos se comparan los resultados obtenidos con y sin inhibición enzimática, empleándose fluoruro sódico como agente inhibidor (Repetto, 1997).

Con este objetivo, se diseñan dos experimentos:

- Experimento 1: 1 mL de plasma acondicionado + 1% NaF + desproteización + 10 μ L Disolución IV/mL sobrenadante \rightarrow R NaF
- Experimento 2: 1 mL de plasma acondicionado + desproteización + 10 μ L Disolución IV/mL sobrenadante \rightarrow R sin NaF

Las recuperaciones para cada fenol en ambos casos (R NaF y R sin NaF) se calculan respecto a la señal que emite el correspondiente patrón en un disolvente puro a la misma concentración (AOAC, 1993). Los resultados de la recuperaciones obtenidas con ambos ensayos se muestran en la Tabla 57.

Se comprueba que al añadir NaF las recuperaciones son superiores para: catequina, resveratrol, morina, quercetina y kaempferol, compuestos que eran los que presentaban mayores dificultades en los apartados anteriores.

Compuesto	C (mg/L)	R NaF	R sin NaF
Gálico	7.0	76	83
Protocatéuico	10.4	76	84
Tirosol	20.9	73	89
Catequina	6.3	88	55
Vainílico	7.1	75	90
Cafeico	8.2	70	96
Epicatequina	10.7	66	78
Cumárico	15.2	80	87
Ferúlico	9.0	76	88
Rutina	7.1	70	65
Resveratrol	5.0	63	44
Morina	8.0	95	21
Quercetina	12.4	60	22
Kaempferol	6.6	65	19

Tabla 57. Efecto de la inhibición de las enzimas del plasma.

C: concentración de la Disolución patrón (mg/L)

R NaF: recuperación con agente inhibidor enzimático

R sin NaF: recuperación sin agente inhibidor enzimático

En resumen, de todos los ensayos realizados sobre la estabilidad de los compuestos fenólicos, se derivan una serie de conclusiones, tal como sigue:

A) Hay una serie de factores que afectan a la medida de estos compuestos en el plasma, y son:

1. Temperatura
2. pH
3. Tiempo de extracción sanguínea
4. Proteínas plasmáticas
5. Enzimas plasmáticas

B) Según esto, hay que admitir ciertos descensos inevitables que se producen al cuantificar los compuestos fenólicos en plasma. Considerando los resultados obtenidos, se puede recomendar:

- Mantener la muestra de plasma siempre a temperaturas inferiores a los -20°C hasta el momento del análisis, que debe ser lo antes posible.
- A la muestra de plasma recién extraída se le añadirá un 1% de ácido ascórbico y $10\ \mu\text{L}/\text{mL}$ de ácido o-fosfórico a fin de mejorar la estabilidad de los fenoles.
- Si las condiciones del ensayo lo permiten, realizar la extracción a la media hora de la ingestión del alimento.
- El tipo de anticoagulante empleado no influye en la estabilidad, pero para aquellos compuestos que son sensibles a las enzimas plasmáticas, como es el caso de los flavonoides catequina, morina, quercetina y el estilbeno resveratrol, se recomienda usar fluoruro sódico que tiene la doble función de anticoagulante e inhibidor enzimático. Por ello se puede usar un vacutainer con NaF como anticoagulante.
- La catequina y la epicatequina no tienen el mismo comportamiento, ya que para incrementar la recuperación de la primera es preciso usar NaF, mientras que con la epicatequina el empleo de NaF no mejora los resultados obtenidos con la desproteinización con tricloroacético.

5. 3. 4. Tratamientos de la Muestra de Plasma para el Análisis. Comparación de Diversos Tratamientos de Muestra de Plasma

En este apartado se han estudiado diversos tratamientos de muestra de plasma con los siguientes objetivos. En un primer lugar, ayudar a mejorar la sensibilidad del método, ya que dado el aporte dietético de compuestos fenólicos estos se hallaran en niveles demasiado bajos para ser detectados. Con el tratamiento de muestra se puede conseguir concentrarlos hasta niveles adecuados para su medida. También se pretende evitar interferencias de las numerosas sustancias presentes en el plasma que pueden dificultar el análisis de los compuestos de interés. Por otro lado, se persigue facilitar la manipulación de la muestra y, además, proteger y prolongar la vida de la columna cromatográfica.

La idoneidad de los métodos de tratamiento de muestra se evalúa en función de su exactitud, que es la concordancia entre el valor verdadero y el que se obtiene con la medida. En general, la exactitud se mide como la recuperación, y para calcularla se pueden seguir diversas estrategias (*Huber, 1998*). Una forma consiste en comparar el valor obtenido con el dado por un método de referencia, otra es el análisis de una muestra certificada. Cuando esto no es posible, que es lo más frecuente, se calcula la recuperación como la comparación de la señal que emite una determinada sustancia en una matriz, con la que emite la misma sustancia en la misma concentración en un disolvente puro, y así es como la describe la AOAC. En este caso, se evalúa la interacción de la matriz con el analito y los resultados dependen de la naturaleza de la muestra, de la concentración del analito y del tratamiento que se aplique. En función de estos tres factores la AOAC da unos valores admisibles de recuperación (*AOAC, 1993*).

Por otra parte, en el caso de la medida de los fenoles en plasma y fluidos biológicos se calcula la recuperación del tratamiento comparando el resultado de la muestra fortificada sin tratar con el resultado obtenido de la misma muestra tras el tratamiento en cuestión. Así, se expresa la recuperación del método como un porcentaje que toma como 100 el valor obtenido sin tratamiento (*Manach et al., 1995; Giachetti et al., 1999*). Este procedimiento mide la cantidad de compuesto que se pierde en el propio tratamiento por la manipulación a la que se somete la muestra.

Tanto en uno como en otro caso, la recuperación se refiere siempre a un nivel concreto de concentración y se puede calcular para uno o varios niveles de adición de patrón. Por ello, se ha estimado oportuno incluir aquí ambos métodos con fines comparativos. Así pues, se han calculado las recuperaciones por los dos procedimientos. Una comparando la señal de la muestra fortificada antes y después del tratamiento, a la que se llama recuperación del tratamiento (R_{to}), y otra, midiendo la señal de los fenoles de la muestra después del tratamiento con la que se obtiene con la misma concentración de cada fenol en un disolvente puro (R_{AOAC}). De esta manera, se podrán diferenciar las pérdidas debidas al tratamiento y las pérdidas debidas a la interacción de la matriz.

Dado que el vino contiene diversos compuestos fenólicos, el propósito de este apartado consiste en comprobar si se pueden determinar simultáneamente en un mismo análisis y cómo influyen los diferentes tratamientos en el conjunto de los fenoles presentes en el vino.

Los distintos métodos que vamos a emplear se propusieron originariamente para un compuesto único. Para el propósito de nuestro estudio parece conveniente ensayarlos para un conjunto de compuestos fenólicos, ya que presumiblemente aquellos que presenten estructuras parecidas se comportan de forma similar.

Como se ha demostrado en el apartado anterior, para procesar adecuadamente las muestras de plasma es preciso controlar varios factores: temperatura, tiempo de manipulación, pH, así como evitar la oxidación de los fenoles. Por ello, todas las muestras de plasma se han procesado de la misma forma: manteniéndolas en el congelador, a temperaturas del orden de los -20°C , desde su extracción hasta el momento del análisis, y añadiéndoles, como se había establecido, un 1% de ácido ascórbico como antioxidante y $10\ \mu\text{L}/\text{mL}$ de ácido o-fosfórico. Los tratamientos que se estudian a continuación tienen por objeto mejorar las recuperaciones obtenidas, y son:

- a) extracción en fase sólida
- b) extracción líquido-líquido
- c) desproteinización de la muestra de plasma

- c. 1. desproteínización con tricloroacético
- c. 2. desproteínización con etanol acidificado
- d) desproteínización más inhibición de las enzimas plasmáticas
 - d. 1. desproteínización con tricloroacético más inhibición de las enzimas plasmáticas
 - d. 2. desproteínización con etanol acidificado más inhibición de las enzimas plasmáticas

a) Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida se realiza sobre muestras de plasma fortificadas con diferentes diluciones de una disolución muy concentrada de todos los fenoles (Disolución IV).

Los resultados obtenidos se recogen en las Tablas 42 (fenoles simples y resveratrol) y 43 (flavonoides).

Para los ácidos hiroxicinámicos y vainílico, y para las proantocianidinas, catequina y epicatequina, las recuperaciones obtenidas, ya sean calculadas según la AOAC (R_{AOAC}) o la recuperación del tratamiento (R_{tto}) son muy similares entre sí. No ocurre igual para los flavonoides de tipo flavonol y para el resveratrol, ya que para estos compuestos hay notables diferencias entre los dos tipos de recuperaciones, debido a la interacción que tienen con la matriz de plasma.

Es de destacar que el fundamento de este procedimiento está basado en la diferente polaridad de los componentes de la muestra. Por ello no deben sorprender las bajas recuperaciones que se obtienen para los compuestos más polares, que eluyen en la fase de lavado.

El procedimiento estudiado de extracción en fase sólida presenta resultados aceptables para los fenoles más apolares, que son el resveratrol y para los flavonoides de tipo flavonol.

Compuesto	mg/L	R _{AOAC}	Media R _{AOAC}	R _{tto}	Media R _{tto}
Vainílico	11.115	19	33.8 ± 13.9	24.2	34.5 ± 10.9
	2.9	26		26	
	2.859	40		43.6	
	2.1				
	1.084	50		44.4	
Cafeico	12.800	28	41.8 ± 14.8	46	40.3 ± 5.4
	3.7	30		38	
	3.184	54		43.4	
	2.4			55	
	1.281	55		33.9	
Cumárico	20.324	49	58.3 ± 17.7	59.7	59.2 ± 14.8
	10.2	43		55	
	5.563	81		78.8	
	5.3	90		96	
	2.426	60		43.2	
Ferúlico	14.003	47	62.7 ± 18.8	52.8	74.0 ± 19.4
	6.6	47		54	
	3.473	80		93.3	
	3.0	86		94	
	1.4	47		63.6	
	1.372	69		86.2	
Resveratrol	5.187	35	40.3 ± 8.2	102	141.2 ± 34.3
	2.611	41			
	2.4	31		100	
	2.107	54		176.5	
	0.725	44		177.9	
	0.9	45		140	
	0.8	32		150.7	

Tablas 58. Recuperaciones obtenidas para los fenoles simples y resveratrol en plasma con extracción en fase sólida.

R_{AOAC}: Recuperaciones según la AOAC MediaR_{AOAC}: media de las R_{AOAC}

R_{tto}: Recuperaciones del tratamiento MediaR_{tto}: media de las R_{tto}

Compuesto	C (mg/L)	R _{AOAC}	Media R _{AOAC}	R _{tto}	Media R _{tto}
Catequina	8.804	13	24.7 ± 9.5	20.8	21.5 ± 10.5
	3.968	31		38.0	
	1.7	20		14.9	
	1.256	17		30	
	0.9	38		14	
	0.0004	29		11	
Epicatequina	14.546	41	47.2 ± 12.5	35.7	57.9 ± 15.7
	5.6	34		65	
	3.930	50		58.7	
	2.8	67		72	
	1.798	44			
Rutina	10.100	46	58.8 ± 16.2	71.3	96.3 ± 21.3
	5.1	46		69	
	2.46	74		119.3	
	0.99	63		108.4	
	2.2	81		111	
	1.1	43		99	
Morina	12.798	6	28.2 ± 9.7	28.5	79.3 ± 53.3
	6.4	9			
	3.6	28		39	
	3.2	56		115.8	
	4.3	42		134	
Quercetina	17.493	20	23.8 ± 9.7	72.7	95.5 ± 18.7
	9.6				
	7.7	40		78	
	4.583	25		108.2	
	2.000	18		105.8	
	1.9	15.9		112.8	
Kaempferol	10.454	19	17.8 ± 3.3	60.8	102.4 ± 49.4
	5.2	23			
	1.6	15		89	
	1.496	17		85.7	
	1.1	15.1		174	

Tablas 59. Recuperaciones obtenidas para los flavonoides en plasma con extracción en fase sólida. R_{AOAC}: Recuperaciones según la AOAC MediaR_{AOAC}: media de las R_{AOAC}
R_{tto}: Recuperaciones del tratamiento MediaR_{tto}: media de las R_{tto}

b) Extracción líquido-líquido

Se ensayaron diversos métodos descritos en la bibliografía que se detallan a continuación. En primer lugar, se empleó acetonitrilo como agente extractante y desproteinizante, según el tratamiento propuesto por *Carando et al., 1998*. Con este procedimiento se obtuvieron recuperaciones inferiores a un 35% para protocatéquico, vainílico, ferúlico, p-cumárico y resveratrol, siendo de un 67 % para el tirosol. Un inconveniente adicional es que el sobrenadante que resulta es difícilmente filtrable, y esto dificulta el manejo de la muestra y la reproducibilidad del método, por todo lo expuesto se desechó este método.

El segundo tratamiento ensayado ha sido el propuesto para la determinación de ferúlico en orina (*Bourne y Rice-Evans, 1999*) y de flavonoides en plasma (*Paganga y Rice-Evans, 1997*). Consiste en una extracción con metanol. Con este procedimiento, las mejores recuperaciones se obtuvieron para los ácidos cumárico, ferúlico y vainílico, las cuales se muestran en la siguiente Tabla. Para el resto de los compuestos fenólicos los resultados no son satisfactorios.

Compuesto	mg/L	R _{AOAC}	Media R _{AOAC}	R _{tto}	Media R _{tto}
Vainílico	12.2	77.4	105.3 ± 44.4	94.4	117.6 ± 25.2
	6.0	82.0		113.9	
	3.0	156.5		144.4	
Cumárico	18.9	59.9	64.1 ± 6.5	71.8	66.9 ± 6.9
	9.5	39.0		41.9	
	4.7	68.7		62.0	
Ferúlico	13.3	59.5	74.7 ± 21.5	69.7	72.9 ± 4.5
	6.7	48.3		50.6	
	3.3	89.9		76.0	

Tabla 60. Recuperaciones obtenidas tras la desproteinización con metanol.
R_{AOAC}: Recuperaciones según la AOAC MediaR_{AOAC}: media de las R_{AOAC}
R_{tto}: Recuperaciones del tratamiento MediaR_{tto}: media de las R_{tto}

Como estos tres compuestos no presentan grandes interacciones con la matriz, las recuperaciones obtenidas, como R_{AOAC} y R_{tto} , son muy similares entre sí.

Con este procedimiento los mejores resultados se obtienen para el ácido vainílico y son aceptables para el ácido ferúlico.

c) Desproteínización de la muestra de plasma

c.1. Desproteínización con tricloroacético

Se toman dos alícuotas de una muestra de plasma y se fortifican con sendas diluciones de la Disolución IV para obtener dos niveles de adición de patrones. Tras esto se realiza la desproteínización con tricloroacético.

Como en los casos anteriores se ofrecen las recuperaciones calculadas por los dos procedimientos (R_{AOAC} y R_{tto}) y las medias de las mismas en la Tabla 61 para cada compuesto.

En general, las recuperaciones conseguidas con este procedimiento no son buenas para la mayoría de los compuestos, lo que puede significar que los fenoles precipiten junto a las proteínas plasmáticas por la acción del ácido tricloroacético que es bastante drástica.

Con este procedimiento, se obtienen recuperaciones superiores al 80% respecto a la muestra sin tratar para los ácidos gálico, protocatéquico y vainílico, y también para el tirosol. Para la rutina la recuperación del tratamiento es del orden del 70%, bastante por encima a la del resto de los flavonoides. Para los demás compuestos fenólicos las recuperaciones son peores.

Compuesto	mg/L	R _{AOAC}	Media R _{AOAC}	R _{tto}	Media R _{tto}
Gálico	5.206	94.8	88.6 ± 8.8	99.7	85.8 ± 19.0
	0.606	82.4		71.8	
Protocatéquico	8.669	79.4	79.9 ± 0.7	109.9	109.7 ± 10.4
	4.335	80.4		109.4	
Tirosol	13.151	99.2	97 ± 3.1	122.0	157.3 ± 49.9
	0.188	94.8		192.6	
Catequina	4.234	53.1	48.2 ± 6.9	66.7	50.7 ± 22.7
	0.130	43.3		34.6	
Vainílico	6.068	79.0	76.1 ± 4.1	95.0	88.6 ± 9.1
	0.857	73.2		82.1	
Cafeico	6.892	74.0	65.7 ± 11.7	66.8	57.2 ± 13.6
	1.886	57.4		47.6	
Epicatequina	8.006	60.3	54.4 ± 8.3	56.7	57.7 ± 1.3
	0.215	48.5		58.6	
Cumárico	12.708	57.6	54.7 ± 4.1	66.6	58.3 ± 11.7
	5.591	51.8		50.0	
Ferúlico	7.471	61.8	55.0 ± 9.7	70.2	63.3 ± 9.8
	1.825	48.1		56.3	
Rutina	5.402	50.7	45.9 ± 6.9	79.3	72.9 ± 9.1
	0.342	41.0		66.4	
Resveratrol	4.642	6.4	5.3 ± 1.6	19.1	15.9 ± 4.5
	1.569	4.1		12.7	
Morina	6.700	2.9	6.8 ± 5.5	12.7	20.8 ± 11.5
	0.045	10.7		28.9	
Quercetina	9.569	1.4	1.5 ± 0.1	5.3	5.9 ± 0.8
	1.221	1.5		6.5	
Kaempferol	5.784	1.2	1.4 ± 0.2	4.0	5.3 ± 1.8
	0.664	1.5		6.5	

Tabla 61. Recuperaciones obtenidas tras la desproteinización con tricloroacético

R_{AOAC}: Recuperaciones según la AOAC MediaR_{AOAC}: media de las R_{AOAC}

R_{tto}: Recuperaciones del tratamiento MediaR_{tto}: media de las R_{tto}

c. 2. Desproteínización con etanol acidificado

Este tratamiento de muestra ha sido descrito para la determinación de quercetina en plasma (*Manach et al., 1995*). Los autores afirman que el etanol acidificado con HCl en concentración de 50 mmol/L tiene la capacidad de romper los enlaces de hidrógeno que se forman entre los polifenoles y las proteínas en general, y en concreto entre la quercetina y la albúmina. De este modo, consiguen recuperaciones de un 95% para la quercetina en plasma.

Se ha realizado la desproteínización con este procedimiento a dos niveles de adición de patrón a sendas muestras de plasma fortificadas con todos los fenoles en estudio. Las recuperaciones medias se muestran en la Tabla 62.

Como se puede apreciar con este método se obtienen recuperaciones superiores al 100% respecto a la muestra sin tratar para los flavonoides (morina, quercetina y kaempferol) y para el tirosol; y recuperaciones por encima del 70% para protocatéquico, rutina y resveratrol.

En general podemos afirmar que la desproteínización con tricloroacético presenta la ventaja de que se necesita menor volumen de ácido para desproteínizar que con etanol acidificado, tan sólo 0.2 mL de ácido por cada mL de muestra. Esto hace que después de la centrifugación se obtiene un volumen de sobrenadante similar al volumen inicial de muestra. Además, el sobrenadante obtenido es transparente y fácilmente manipulable, por lo que se puede optar por filtrar e inyectar. De esta forma se evita la fase de secado en rotavapor, con el consiguiente ahorro de tiempo y simplificado del proceso.

La desproteínización por ambos métodos ensayados, tricloroacético y con etanol acidificado (*Manach et al., 1995*), ofreció en general mejores resultados que las extracciones líquido-líquido.

Patrón	mg/L		R_{AOAC}		R_{TTO}
Gálico	2.562	47.4	35.3 ± 17.1	42.6	32.3 ± 14.6
	3.043	23.2		21.9	
Protocatéquico	3.573	65.2	56.2 ± 12.8	86.4	74.5 ± 16.8
	3.939	47.1		62.6	
Tirosol	6.724	55.8	55.9 ± 0.1	138.4	106.3 ± 45.4
	7.865	56		74.2	
Catequina	13.204	24.6	20.8 ± 5.4	43.7	36.9 ± 9.7
	13.710	17		30	
Vainílico	2.869	55.9	52 ± 5.6	61.7	57.1 ± 6.6
	2.673	48		52.4	
Cafeico	3.553	60.4	51.4 ± 12.8	49	41.9 ± 10.1
	3.376	42.3		34.7	
Epicatequina	3.859	11.4	19.4 ± 11.2	14.2	23.2 ± 12.7
	3.557	27.3		32.2	
Cumárico	5.777	55.4	44 ± 16.1	55.1	43.4 ± 16.5
	5.543	32.6		31.7	
Ferúlico	3.910	59.4	43.6 ± 22.3	68.8	50.6 ± 25.7
	3.525	27.8		32.4	
Rutina	2.306	51.4	48.1 ± 4.7	82.8	77.7 ± 7.3
	2.034	44.7		72.5	
Resveratrol	2.130	24.6	21.8 ± 4.0	79.8	72.6 ± 10.3
	1.417	18.9		65.3	
Morina	2.830	47.9	47.9	133.3	133.3
	2.830	-			
Quercetina	2.805	26.9	24.1 ± 4.0	137.2	124 ± 18.7
	2.658	21.3		110.8	
Kaempferol	1.751	32.2	30.4 ± 2.5	217.3	176.2 ± 58.2
	1.751	28.6		135	

Tabla 62. Recuperaciones obtenidas tras la desproteínización con tricloroacético

R_{AOAC} : Recuperaciones según la AOAC $MediaR_{AOAC}$: media de las R_{AOAC}

R_{tto} : Recuperaciones del tratamiento $MediaR_{tto}$: media de las R_{tto}

d) Inhibición de la actividad enzimática del plasma más desproteinización

Puesto que se ha demostrado que la catequina y los flavonoles se ven afectados por las enzimas plasmáticas, se ha estimado conveniente incluir en el tratamiento de muestra una etapa para lograr una inhibición enzimática junto con la desproteinización. Como agente inhibidor de las enzimas plasmáticas se emplea NaF en cantidad aproximada de un 1% en peso (*Repetto, 1997*). Cuando se añade NaF al plasma la viscosidad de la muestra aumenta haciendo difícil su filtración, por lo que se hace necesario un tratamiento de desproteinización para poder determinar los fenoles. Así pues, se combinó la adición de NaF con los dos métodos de desproteinización ya ensayados, tanto con ácido tricloroacético como con etanol acidificado.

d.1.) Inhibición de la actividad enzimática del plasma más desproteinización con tricloroacético

A una muestra de plasma se le añade el agente inhibidor enzimático (NaF) y se realiza la adición de patrón. Se desproteiniza con tricloroacético. Para cada compuesto se ofrecen las recuperaciones obtenidas en la Tabla 47.

Las recuperaciones del tratamiento obtenidas son aceptables para tirosol, protocatéutico, morina, quercetina y kaempferol.

Resulta de destacar el hecho de que para la rutina los resultados son muy parecidos a los obtenidos con la desproteinización con tricloroacético sin emplear inhibidor enzimático, mientras que para el resto de los flavonoles los resultados mejoran cuando se añade el NaF (Tabla 45).

Patrón	C (mg/L)	R _{AOAC}	R _{TTO}
Gálico	2.777	21.6	19.8
Protocatéquico	4.455	60.4	81.4
Tirosol	7.282	51.5	112.3
Catequina	16.432	35.8	66.0
Vainílico	3.566	47.8	54.4
Cafeico	4.071	209.6	41.4
Epicatequina	5.593	38.8	39.5
Cumárico	7.091	41.0	42.4
Ferúlico	4.498	43.4	50.0
Rutina	2.571	43.9	70.5
Resveratrol	1.787	13.2	44.0
Morina	3.805	66.0	215.2
Quercetina	2.473	17.1	92.1
Kaempferol	1.790	18.5	86.2

Tabla 63. Recuperaciones obtenidas tras inhibición de la actividad enzimática y la desproteinización con tricloroacético.

d.2.) Inhibición de la actividad enzimática del plasma más desproteinización con etanol acidificado

A la muestra se le adiciona el inhibidor enzimático, se realiza la adición de patrones y se desproteiniza con etanol acidificado. Se ofrecen las recuperaciones así obtenidas para cada compuesto en la Tabla 48.

Es de destacar que las recuperaciones del tratamiento son buenas para la mayoría de los compuestos, incluso las recuperaciones obtenidas según la AOAC se encuentran dentro de los límites establecidos para ácido gálico, protocatéquico, tirosol, vainílico y cafeico.

Compuesto	C mg/L	R _{AOAC}	R _{MOSA}
Gálico	5.339	87.1	92.1
Protocatequico	7.878	82.2	113.3
Tirosol	15.73	87.5	96.6
Catequina	26.408	60.0	118.3
Vainílico	5.738	80.4	96.1
Cafeico	6.752	80.0	72.1
Epicatequina	7.114	61.6	59.2
Cumárico	11.554	67.6	77.1
Ferúlico	7.82	-	-
Rutina	4.612	65.7	103.4
Resveratrol	4.60	22.7	68.2
Morina	6.966	28.0	124.4
Quercetina	5.61	29.0	120.2
Kaempferol	2.79	36.4	143.6

Tabla 64. Recuperaciones obtenidas tras inhibición de la actividad enzimática y la desproteínización con etanol acidificado.

La Tabla 65 ofrece las recuperaciones obtenidas con ambos tratamientos.

Como conclusión, se puede afirmar que cuando se usa NaF se obtienen mejores resultados si la desproteínización se efectúa con etanol acidificado. Es importante resaltar que este tratamiento es el más adecuado para determinar simultáneamente todos los compuestos fenólicos en estudio.

Compuesto	R _{tt01}	R _{tt02}
Gálico	19.8	92.1
Protocatéquico	81.4	113.5
Tirosol	112.3	96.6
Catequina	66.0	118.8
Vainílico	54.4	96.1
Cafeico	41.4	72.1
Epicatequina	39.5	59.2
Cumárico	42.4	77.1
Ferúlico	50.0	-
Rutina	70.5	103.4
Resveratrol	44.0	68.2
Morina	215.2	124.4
Quercetina	92.1	120.2
Kaempferol	86.2	143.6

Tabla 65. Comparaciones de desproteinizaciones con inhibición de la actividad enzimática.

R_{tt01} Recuperaciones obtenidas tras inhibición de la actividad enzimática y la desproteización con tricloroacético.

R_{tt02} Recuperaciones obtenidas tras inhibición de la actividad enzimática y la desproteización con etanol acidificado.

Resumen de tratamientos para determinación de compuestos fenólicos por separado en muestras de plasma:

- **Ácido gálico:** desproteínezación con tricloroacético (R_{TTO} 85.8) o con etanol acidificado más inhibición enzimática (R_{TTO} 92.1).
- **Ácido protocatéquico:** desproteínezación con tricloroacético (R_{TTO} 109.7), pero mejor con etanol acidificado más inhibición enzimática (R_{TTO} 113.5).
- **Tirosol:** desproteínezación con tricloroacético (R_{TTO} 157.3) o desproteínezación con tricloroacético más inhibición enzimática (R_{TTO} 112.3).
- **Catequina:** es necesario inhibir las enzimas plasmáticas y desproteínezar con etanol acidificado (R_{TTO} 118.8).
- **Ácido vainílico:** el mejor resultado se obtiene con desproteínezación con metanol (R_{TTO} 117.6). También inhibición enzimática más desproteínezación con etanol acidificado (R_{TTO} 96.1).
- **Ácido cafeico:** es necesario inhibir las enzimas plasmáticas y desproteínezar con etanol acidificado (R_{TTO} 80) igual que para la catequina.
- **Epicatequina:** es necesario inhibir las enzimas plasmáticas y desproteínezar con etanol acidificado (R_{TTO} 61.6) igual que para la catequina.
- **Ácido p-cumárico:** es necesario inhibir las enzimas plasmáticas y desproteínezar con etanol acidificado (R_{TTO} 77.1).
- **Ácido ferúlico:** desproteínezación con metanol (R_{TTO} 74.7). Se obtienen similares recuperaciones con la extracción en fase sólida.
- **Rutina:** la mejor recuperación se obtiene con inhibición de las enzimas plasmáticas y desproteínezar con etanol acidificado (R_{TTO} 103.4). También se puede hacer la extracción en fase sólida con cartuchos (R_{TTO} 96.6).
- **Resveratrol:** la mejor recuperación se obtiene con la extracción en fase sólida con cartuchos (R_{TTO} 141).

- Morina: desproteinización con etanol acidificado (R_{TTO} 133.3) o con tricloroacético cuando se adiciona NaF (R_{TTO} 215.2).
- Quercetina: desproteinización con etanol acidificado, ya sea con o sin inhibición de enzimas plasmáticas. También se puede hacer la extracción en fase sólida con cartuchos (R_{TTO} 95.5).
- Kaempferol: al igual que la quercetina desproteinización con etanol acidificado, ya sea con o sin inhibición de enzimas plasmáticas. También se puede hacer la extracción en fase sólida con cartuchos (R_{TTO} 102.2).

Resumen de tratamientos para determinación de compuestos fenólicos de forma simultánea en muestras de plasma

- Extracción en fase sólida: ácido ferúlico, resveratrol, rutina, morina, quercetina y kaempferol.
- Desproteinización con tricloroacético: ácidos gálico, protocatéquico, vainílico y tirosol.
- Desproteinización con etanol acidificado: ácido protocatéquico, tirosol, rutina, resveratrol, morina, quercetina y kaempferol.
- Inhibir las enzimas plasmáticas y desproteinizar con etanol acidificado: catequina, epicatequina, ácidos vainílico, cafeico y p-cumárico, flavonoides, rutina, morina, quercetina y kaempferol.

5. 3. 3. Métodos Analíticos para Determinar Compuestos Fenólicos en Orina. Comparación de Diversos Tratamientos de Muestra.

La presencia de una sustancia en la orina puede ser considerada como una evidencia indirecta de que la misma ha sido absorbida, aunque, por otro lado, si las concentraciones en orina son muy altas el compuesto en cuestión ha pasado por el organismo sin sufrir ninguna transformación, lo que podría ser indicativo de que no ha ejercido ningún efecto.

En el proceso de formación de la orina se filtran las macromoléculas de radio menor a 20 °A, como es el caso de la inulina, pero la permeabilidad es nula para sustancias con radio mayor de 40 A (*Tresguerres et al., 1999*). Por otra parte, la elevada cantidad de sustancias excretadas por esta vía hacen de la muestra de orina una disolución compleja.

En primera instancia, las muestras se inyectaron directamente, según las condiciones cromatográficas descritas por *Roggero et al., 1991*. Sin embargo, durante los primeros 45 minutos se observaron numerosas sustancias que absorben en el UV-VIS. No es de extrañar este hecho, porque la orina es el producto final de los procesos de biotransformación encaminados a la síntesis de metabolitos muy polares para su eliminación del organismo (*Flores et al., 1992*). La mayoría de los compuestos fenólicos aparecen impuros y, además, ninguno de ellos con tiempo de retención menor de 40 minutos tiene buena resolución, por lo que su determinación resulta imposible. Se ha realizado la comparación espectral de todos los picos que aparecen y ninguno de ellos corresponde a ningún fenol ensayado.

Posteriormente, se probaron desproteinizaciones descritas en *Material y Métodos*, usando bien ácido tricloroacético, o bien etanol acidificado. Sin embargo, los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que un tratamiento de desproteización no resuelve el problema analítico debido a que la presencia de proteínas en la orina es muy inferior a la del plasma. Por ello, una desproteización alarga el proceso de manipulación de la muestra innecesariamente y no elimina las interferencias debidas a los compuestos polares.

El gradiente que se emplea con esta finalidad ha sido descrito para la determinación de resveratrol y compuestos relacionados en vinos (*Roggero y Archier, 1994*) tal como se refiere en el capítulo de *Material y Métodos* (pág.) de la presente Memoria.

Tal como se recoge en la siguiente tabla se consiguen buenas resoluciones para los ácidos p-cumárico y ferúlico, el estilbeno resveratrol y los flavonoides rutina, morina, quercetina y kaempferol.

Por todo lo expuesto se ha optado por este gradiente y optimizar un método para la determinación para la determinación simultánea en orina de: los ácidos p-cumárico y ferúlico, resveratrol y los flavonoides rutina, morina, quercetina y kaempferol.

El objetivo del presente capítulo consiste en comparar diversos tratamientos de muestra de orina para la medida de compuestos fenólicos del vino. Así pues se han ensayado dos procedimientos:

- a) una extracción en fase sólida
- b) una extracción líquido-líquido

a) Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida es uno de los métodos de preparación de muestra más empleado en el análisis de fármacos y tóxicos en orina. Se ha realizado el mismo procedimiento descrito para las muestras de plasma con cartuchos C18.

Los resultados obtenidos al hacer la extracción para tres niveles de adición de patrón, se muestran a continuación en la Tabla 66.

Para todos los compuestos fenólicos las recuperaciones de este tratamiento se encuentran por encima del 80%. Los resultados obtenidos para los ácidos cumárico y ferúlico son mejores que los obtenidos en plasma con el mismo procedimiento.

Compuesto	C (mg/L)	Raoac	Raoac	Rtto	Rtto
Cumárico	12.071	93.3	81.4 ± 10.8	116.7	90.9 ± 22.8
	9.023	78.5		73.4	
	2.785	72.3		82.7	
Ferúlico	7.952	87.6	77.8 ± 8.6	106.1	84.4 ± 19.1
	6.168	74.2		70.5	
	2.008	71.6		76.5	
Rutina	4.176	89.9	76.3 ± 11.9	102.2	81.3 ± 18.2
	3.368	71.7		72.9	
	1.133	67.4		68.8	
Resveratrol	2.327	90.8	55.3 ± 33.7	103.8	82.0 ± 21.4
	2.818	51.4		61	
	0.601	23.8		81.3	
Quercetina	4.025	123	123	151.3	151.3
	5.157	75.5		95.4	
	0.466	86.9		274.4	
Kaempferol	2.790	97.6	97.6		-
	3.640	61		96	
	0.567	100.3		314.8	

Tabla 66. Recuperaciones obtenidas para los compuestos fenólicos en muestras de orina con tratamiento de extracción en fase sólida

b) Extracción líquido-líquido

El procedimiento empleado ha sido descrito para la determinación de ácido ferúlico en orina (*Bourne y Rice-Evans, 1999*) y consiste en una extracción líquido-líquido, cuyo procedimiento es el siguiente: a 1 mL de orina se le añaden 100 µL de HCl (5M) y 2.4 mL de metanol. Se tapa y se mezcla bien durante 30 segundos. Se centrifuga a 800 g y 4°C durante 10 minutos. Se toma el sobrenadante y se elimina el metanol por evaporación en rotavapor a vacío a 40°C. La fracción acuosa que resulta se filtra y se inyecta en el HPLC.

Los resultados obtenidos al realizar el tratamiento a tres muestras de orina adicionadas de patrón se ofrecen en la Tabla 67.

A diferencia de lo que ocurría con el plasma, al aplicar este tratamiento en muestras de orina se obtienen recuperaciones aceptables para la mayoría de los fenoles y no sólo para los fenoles simples.

Compuesto	C (mg/L)	Raoac	Raoac	Rtto	Rtto
Cumárico	8.874	102.6	74.9 ± 23.5	94.4	73.9 ± 17.8
	4.735	62.3		64.4	
	4.631	60.5		62.8	
Ferúlico	6.371	97.9	87.8 ± 18.9	96.0	91.2 ± 19.3
	3.413	66.0		69.6	
	2.86	99.5		107.6	
Rutina	3.681	98.1	76.2 ± 19.6	108.8	83.1 ± 22.9
	1.927	60.3		65.1	
	1.699	70.3		75.3	
Resveratrol	2.261	50.5	57.5 ± 7.8	49.6	65.8 ± 19.9
	1.02	56.1		59.9	
	0.357	65.9		88.0	
Quercetina	2.538	195.7	128.4 ± 58.3	140.5	
	0.792	92.9		170.8	
	0.046	96.6		357.6	
Kaempferol	2.315	137.7		140.9	
	1.025	77.5		-	
	0.81	59.8		-	

Tabla 67. Recuperaciones obtenidas para los compuestos fenólicos en muestras de orina con tratamiento de extracción líquido-líquido

Como conclusiones de los ensayos de orina se puede decir que, en general, ambos procedimientos son adecuados para los siete compuestos fenólicos con las siguientes excepciones:

Para el ácido p-cumárico y el resveratrol se obtienen mejores recuperaciones con la extracción en fase sólida.

Para el ácido ferúlico se obtienen mejores recuperaciones con la extracción líquido-líquido.

Para la determinación en orina de fenoles y sus posibles metabolitos, se hace necesario plantear un proceso de extracción previo al análisis HPLC. Esto se debe a los niveles de concentración tan bajos que cabe esperar en este tipo de muestras y al alto contenido en orina de compuestos complejos y diversos, que dan un alto número de picos no identificados.

5. 3. 6. Estudios con voluntarios humanos. Medidas en orina.

Para probar los métodos analíticos puestos a punto se diseñaron diversos experimentos con voluntarios humanos.

Se administró a dos voluntarios una dosis oral de 300 mL de un mosto tinto comercial. Los voluntarios habían hecho una dieta con ausencia de compuestos fenólicos durante las 24 horas anteriores al experimento. La ingesta se realizó a media mañana y la toma de muestra de orina se hizo a las dos horas aproximadas. Las muestras de orina se analizaron inmediatamente mediante inyección directa de la muestra. Se pudieron detectar en ambas muestras trans-resveratrol y su glucósido, siendo sus niveles inferiores a los límites de cuantificación.

Por otro lado, otro voluntario realizó una dieta rica en frutas, verduras y aceite de oliva pero exenta de vino o mosto. La toma de muestra se realizó a las dos horas de la ingesta. Se realizó un tratamiento de desproteínización de la muestra con tricloroacético seguida de evaporación en rotavapor.

Por último, dos voluntarios tomaron una dieta consistente en dos vasos de mosto tinto, una copa de rioja, gazpacho, zumo de naranja y se completó con un

suplemento multivitamínico. Las muestras se congelaron para realizar el análisis al día siguiente. Se realizó una extracción con cartuchos. En los cromatogramas del fotodiodos se pudieron detectar picos con espectro de absorción similar a los ácidos cafeico, cumárico y ferúlico. También espectros coincidentes con el glucósido del trans-resveratrol. De forma contraria a lo que se esperaba no se consiguieron mejores picos con el suministro de un suplemento vitamínico. Esto se podría explicar con la presencia de 10 mg de sulfato ferroso en dichos suplementos, el cual puede actuar como prooxidante.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Primera

En todos los vinos tintos analizados se ha encontrado trans- o cis-resveratrol o/y alguno de sus glucósidos. En las muestras de vinos blancos jóvenes se han encontrado alguno de estos compuestos en más de un 60% de las mismas. Ninguno de ellos han sido detectados en los vinos generosos analizados.

Segunda

Se ha constatado una correlación directa entre el aumento de presión ejercida y los niveles de resveratrol total en el mosto resultante. También se ha corroborado que el factor ambiental influye en los niveles de resveratrol, porque los vinos elaborados en la etapa de sequía tenían niveles de resveratrol más bajos que otros elaborados en igualdad de condiciones pero con niveles de lluvia normales.

Tercera

El cis-resveratrol y su glucósido se encuentran en pocas muestras, pero en las que están presentes la proporción de cis- sobre trans- es con frecuencia superior a la unidad.

Cuarta

Al someter una disolución patrón hidroalcohólica de compuestos fenólicos a ensayos de digestión, los flavonoides se ven afectados en una extensión mayor que los ácidos fenólicos simples, excepto para el ácido gálico que disminuyó cerca de un 50% tras el tratamiento intestinal debido al pH del medio.

Quinta

En general, los compuestos fenólicos presentes en el vino parecen ser más estables a las condiciones gastrointestinales en el mismo que cuando se ensaya una disolución patrón. En las muestras de vino los niveles de ácido gálico aumentan en la mayoría de los casos, como también ocurre con catequina y quercetina.

El resveratrol y los compuestos relacionados, demostraron ser bastante resistentes a las condiciones gastrointestinales.

Sexta

El detector de fluorescencia permite la corroboración de los compuestos identificados por el fotodiodo como tirosol, catequina, ácido vainílico, epicatequina y resveratrol en muestras de plasma.

En muestras de orina, el detector de fluorescencia permite detectar transresveratrol y su glucósido en concentraciones muy bajas.

Séptima

La determinación de los compuestos fenólicos en plasma está afectada por una serie de factores, que son: temperatura, pH, proteínas plasmáticas y enzimas plasmáticas.

Octava

Los tratamientos que ofrecen mejores resultados para determinación de compuestos fenólicos de forma simultánea en muestras de plasma son:

- Extracción en fase sólida: ácido ferúlico, resveratrol, rutina, morina, quercetina y kaempferol.
- Desproteización con tricloroacético: ácidos gálico, protocatéuico, vainílico y tirosol.
- Desproteización con etanol acidificado: ácido protocatéuico, tirosol, rutina, resveratrol, morina, quercetina y kaempferol.
- Inhibir las enzimas plasmáticas y desproteizar con etanol acidificado: catequina, epicatequina, ácidos vainílico, cafeico y p-cumárico, flavonoides, rutina, morina, quercetina y kaempferol.

Novena

Para la determinación en orina de fenoles y sus posibles metabolitos, se hace necesario plantear un proceso de extracción previo al análisis HPLC. Esto se debe a los niveles de concentración tan bajos que cabe esperar en este tipo de muestras y al alto contenido en orina de compuestos complejos y diversos, que dan un alto número de picos no identificados.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- ABEYWARDENA, M.Y.; HEAD, R.J. (1996). Vascular protective actions of natural antioxidants. In Packer, L. & M.G. Traber (Eds.), *International symposium on natural antioxidants molecular mechanisms and health* (AOCS Press ed. pp. 584-594). AOCS Press.
- ADRIAN, M.; RAJAEI, H.; JEANDET, P.; VENEAU, J.; BESSIS, R. (1998). Resveratrol oxidation in *Botrytis cinerea* conidia. *Phytopathology* 88,5, 472-476.
- ADRIAN, M.; JEANDET, P.; BREUIL, A.C.; LEVITE, D.; DEBORD, S.; BESSIS, R. (2000). Assay of resveratrol and derivative stilbenes in wines by direct injection high performance liquid chromatography. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51, 37-41.
- AFANASLEV, I.B.; DOROZHKO, A.I.; BORDSKII, A.V. (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 38, 1763-1769.
- AGEWALL, S.; WRIGHT, S.; DOUGHTY, R.N.; WHALLEY, G.A.; DUXBURY, M.; SHARPE, N. (2000). Does a glass of red wine improve endothelial function? *European Heart Journal* 21, 74-78.
- ÁLVAREZ-SALA WALTHER, L.A.; MILLÁN NÚÑEZ-CORTÉS, J.; OYA OTERO, M. (1996). La dieta mediterránea en España. ¿Leyenda o realidad? (I). El estudio de los Siete Países. Algunos elementos de la dieta mediterránea: el aceite de oliva y el vino tinto. *Revista Clínica Española*, vol. 196 (8), 548-556.
- AMASURIYA, R.N.; GUPTA, A.K.; CIVEN, M.; HORNG, Y.G.; MAEDA, T.; KASHYAP, M.L. (1992). Ethanol stimulates apolipoprotein A-I secretion by human hepatocytes: implications from a mechanism for atherosclerosis protection. *Metabolism* 41, 827-832.
- AMES, B.N. (1983). Dietary carcinogens and anti-carcinogens. *Science* 221, 1256-1260.
- ANDLAUER, W.; KOLB, J.; SIEBERT, K.; FÜRST, P. (2000). Assessment of resveratrol bioavailability in the perfused small intestine of the rat. *Drugs Exptl. Clin. Res.*, XXVI, 47-55.
- ANDRIAMBELOSON, E., MAGNIER, C., HAAN-ARCHIPOFF, G., LOBSTEIN, A., ANTON, R., BERETZ, A., STOCLET, J.C., & ANDRIANTSITOHAINA, R. (1998). Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *Journal of Nutrition*, 128, 2324-2333.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 1970. Ed. 11. Editor W. Horwitz. Washington. pág.873

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS AOAC. Peer Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures. (1993). Arlington, Virginia, USA.
- ARNOLD, R.A.; NOBLE, A.C.; SINGLETON, V.L. (1980). Bitterness and astringency of phenolic fractions in wine. *J. Agric. Food Chem.* 28, 675-678.
- ARICHI, H.; KIMURA, Y.; OKUDA, H.; BABA, K.; KOZAWA, M.; ARICHI, S. (1982). Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. on lipid metabolism. *Chem.Pharm.Bull.*, 30, 1766-1770.
- ARTS, I.C.W.; HOLLMAN, P.C.H. (1998). Optimization of a quantitative method for the determination of catechins in fruits and legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 5156-5162.
- BABA, S.; OSAKABE, N.; NATSUME, M.; YASUDA, A.; TAKIZAWA, T.; NAKAMURA, T.; TERAOKA, J. (2000). Cocoa powder enhances the level of antioxidative activity in rat plasma. *British Journal of Nutrition*, 84, 673-680.
- BAVARESCO, L.; CANTÙ, E.; FREGONI, M.; TREVISAN, M. (1997). Constitutive stilbene contents of grapevine cluster stems as potential source of resveratrol in wine. *Vitis*, 36, 115-118.
- BAVARESCO, L.; FREGONI, C.; TREVISAN, M.; FORTUNATI, P. (2000). Effect of cluster stems on resveratrol content in wine. *Ital.J.Food Sci.*, 1, 103-108.
- BERTELLI, A.A.E.; GIOVANNINI, L.; de CATERINA, R.; BERNINI, W.; MIGLIORI, M.; FREGONI, M.; BAVARESCO, L.; BERTELLI, A. (1996a). Antiplatelet activity of cis-resveratrol. *Drugs Exptl.Clin.Res*, XXII, 61-63.
- BERTELLI, A.A.E.; GIOVANNINI, L.; STRADI, R.; URIEN, S.; TILLEMENT, J.P.; BERTELLI, A. (1996b). Kinetics of trans- and cis-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after red wine oral administration in rats. *Int.J.Clin.Pharm.Res.*, XVI, 77-81.
- BESSIS, R.; JEANDET, P.; ADRIAN, M.; BREUIL, A.C.; DEBORD, S. (1996). Resvératrol, défenses naturelles de la vigne et image santé du vin. *Revue des Oenologues*, 85, 5-8.
- BLOND, J.P.; DENIS, M.P.; BEZAR, D.J. (1995). Action antioxydante du resvératrol sur la lipoperoxydation. *Sciences des Aliments*, 15, 347-358.
- BOKKENHEUSER, V.D.; SHACKETON, C.H.L.; WINTER, J. (1987). Hydrolysis of dietary flavonoide glycosides by strains of intestinal bacteroides from humans. *Biochem. J.* 248, 953-956.
- BOOTH, A.N.; MURRAY, C.W.; JONES, F.T.; DEEDS, F. (1956). The metabolic fate of rutin and quercetina in the animal body. *J. Biol. Chem.*, 233, 251-257.

- BORS, W.; SARAN, M. (1987). Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Radical Res. Commun.* 2, 289-294.
- BOURNE, L.C.; RICE-EVANS, C.A. (1999). Detecting and measuring bioavailability of phenolics and flavonoids in humans: pharmacokinetics of urinary excretion of dietary ferulic acid. In Packer, L. (Ed.), *Methods in enzymology* (pp. 91-106). Berkeley, California: Academic Press.
- BOURNE, L.C.; PAGANGA, G.; BAXTER, D.; HUGHES, P.; RICE-EVANS, C. (2000). Absorption of ferulic acid from low-alcohol beer. *Free Rad. Res.*, 32, 273-280.
- BURNS, J.; GARDNER, P.T.; O'NEIL, J.; CRAWFORD, S.; MORECROFT, I.; MCPHAIL, D.B.; LISTER, C.; MATTHEWS, D.; MACLEAN, M.R.; LEAN, M.E.J.; DUTHIE, G.G.; CROZIER, A. (2000). Relationship among Antioxidant Activity, Vasodilation Capacity, and Phenolic Content of red Wines. *American Chemical Society*, 48, 220-230.
- CADENAS, S.; BARJA, G. (1999). Resveratrol, melatonin, vitamin E, and PBN protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO₃. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1531-1537.
- CASTELLUCCIO, C.; BOLWELL, G.P.; GERRISH, C.; RICE-EVANS, C. (1996). Differential distribution of ferulic acid to the major plasma constituents in relation to its potential as an antioxidant. *Biochem.J.*, 316, 691-694.
- CARANDO, S.; TEISSEGRE, P.L.; CABANIS, J.C. (1998). Comparison of (+)-catechin determination in human plasma by high-performance liquid chromatography with two types of detection: fluorescence and ultraviolet. *Journal of Chromatography B*, 707, 195-201.
- CARANDO, S.; TEISSEGRE, P.L.; CABANIS, J.C. (1999). Dosage de certains composés phénoliques du vin par CLHP / fluorescence. *Ann.Fals.Exp.Chim.*, 92, 41-50.
- CARBO, N.; COSTELLI, P.; BACCINO, F.M.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; ARGILES, J.M. (1999). Resveratrol, a natural product present in wine, decreases tumor-growth in a rat-tumor model. *Biochem.Biophys.Res.Com.*, 254, 739-743.
- CARBONNEAU, M.A.; LÉGER, C.L.; DESCOMPS, B.; SENGLAT, C.; FOURET, G.; MICHEL, F.; MONNIER, L. (1998). «Increase of antioxidant capacity of plasma and vitamin E content of LDL in human volunteers receiving red-wine alcohol-free phenolic compounds», Proceedings of the World Conference on Oilseed and Edible Oils Processing, Vol 2 : Advances in Oils and Fats, Antioxidants and Oilseed By-Products. AOCS Press, Champaign, Ill, 284-288.
- CARBONNEAU, M.A.; LÉGER, C.L.; MONNIER, L.; BONNET, C.; MICHEL, F.; FOURET, G.; DEDIEU, F.; DESCOMPS, B. (1997). Supplementation with red wine phenolics increases the antioxidant capacity of plasma and vitamin E of low density lipoprotein without changing the lipoprotein

- Cu²⁺- oxidability: Possible explanation by phenolics location», *European Journal of Clinical Nutrition*; 51: 682-690.
- CARTRON, E.; CARBONNEAU, M.A.; FOURET, G.; DESCOMPS, B.; LÉGER, C.L. (2001). Specific antioxidant activity of caffeoyl derivatives and other natural phenolic compounds: LDL protection against oxidation and decrease in the proinflammatory lysophosphatidylcholine production. *Journal of Natural Products* 64, 4, 480-486.
- CASSIDY, A., HANLEY, B.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. (2000). Review Isoflavones, lignans and stilbenes-origins, metabolism and potential importance to human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1044-1062.
- CASTELLARI, M.; SPINABELLI, U.; RIPONI, C.; AMATI, A. (1998). Influence of some technological practices on the quantity of resveratrol in wine. *Z Lebensm Unters Forsch A*, 206, 151-155.
- CHEN, C.K.; PACE-ASCIAK, C.R. (1996). Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. *General Pharmacology*, 27, 363-366.
- CHEYNIER, V.; PRIEUR, C.; GUYOT, S.; RIGAUD, J.; MOUTOUNET, M. (1997). The structures of tannins in grapes and wines and their interactions with proteins. *Wine: nutritional and therapeutic benefits* (ACS ed. pp. 81-93). American Chemical Society.
- CHU, Q.; O'DWYER, M.; ZEECE, M.G. (1998). Direct analysis of resveratrol in wine by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 509-513.
- CHUNG, M.I.; TENG, C.M.; CHENG, K.L.; KO, F.N.; LIN, C.N. (1992). An antiplatelet principle of *Veratrum formosanum*. *Planta Med.* 58, 274-276.
- CLIFFORD, M.N. (2000). Review Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1033-1043.
- COLDITZ, G.A.; BRANCH, L.G.; LIPNICK, R.J. (1985). Moderate alcohol and decreased cardiovascular mortality in an elderly cohort. *Am. Heart J.* 109, 886-889.
- COOK, N.C.; SAMMAN, S. (1996). Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*, 7, 66-76.
- CREASY, L.L.; COFFEE, M. (1988). Phytoalexin production potential of grape berries. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113(2), 230-234.
- CUI, H.; HE, C.; ZHAO, G. (1999). Determination of polyphenols by high-performance liquid chromatography with inhibited chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A*, 855, 171-179.

- CUTLER, R.G. (1984). Antioxidants, aging, and longevity. In *Free Radicals in Biology*; Pryor, W. A., Ed.; Academic Press: New York, 371-428.
- da SILVA, J.M.R.; RIGAUD, J.; CHEYNIER, V.; CHEMINAT, A.; MOUTOUNET, M. (1991). Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry*, 30 (4), 1259-1264.
- da SILVA, E.L.; PISKULA, M.; TERAJO, J. (1998). Enhancement of antioxidant ability of rat plasma by oral administration of (-)-epicatechin. *Free Rad. Biol. Med.*, 24, 1209-1216
- DAS, N.P.(1971). Studies on flavonoid metabolism: Absorption and metabolism of (+)-catechin in man. *Biochem. Pharmacol.*, 20, 3435-3445.
- de GAULEJAC, N.S.C.; PROVOST, C.; VIVAS, N. (1999). Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 425-431.
- de la TORRE-BORONAT (1998). Aspectos sobre vino y salud. Jornadas de la viña y el vino. Consejería de Agricultura. Jerez de la Frontera.
- de REVEL, G.; HOGG, T.; SANTOS, C. (1996). Analyse du cis- et trans-resveratrol dans les vins produits au Portugal. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 30, 31-37.
- de VRIES, J.H.M.; HOLLMAN, P.C.H.; MEYBOOM, S.; BUYSMAN, M.N.C.P.; ZOCK, P.L.; van STAVEREN, W.A.; KATAN, M.B. (1998). Plasma concentrations and urinary excretion of the antioxidant flavonols quercetin and kaempferol as biomarkers for dietary intake. *Am.J.Clin.Nutr.*, 68, 60-65.
- DOLL, R.; PETO, R. (1981). The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.* 66, 1191-1308.
- DONOVAN, J.L.; BELL, J.R.; KASIMKARAKAS, S.; GERMAN, J.B.; WALZEM, R.L. (1999a). Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. *Journal of Nutrition*, 129, 1662-1668.
- DONOVAN, J.L.; LUTHRIA, D.L.; STREMPLE, P.; WATERHOUSE, A.L. (1999b). Analysis of (+)-catechin, (-)-epicatechin and their 3'-and 4'-O-methylated analogs. A comparison of sensitive methods. *Journal of Chromatography B*, 726, 277-283.
- DRAGSTED, L.O.; NIELSEN, S.E.; KALL, M.; YOUNG, J. (1997). Polyphenolic antioxidants: biotransformation and human excretion. *Polyphenols in food* pp. 91-95. Ed. R. Armadò; H. Andersson; S. Bardócz; F. Serra. Aberdeen, Scotland: EUR 18169.
- ELATTAR, T.M.A.; VIRJI, A.S. (1999). The effect of red wine and its components on growth and proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Anticancer Research*, 19, 5407-5414.

- ESTRUCH, R. (2000). Wine and cardiovascular disease. *Food Research International*, 33, 219-226.
- FARRÉ-ROVIRA, R.; FRASQUET-PONS, I. (1991). Nuevas perspectivas en la dieta mediterránea. *Nutr. Clin.* 11 (6), 240-249.
- FERRERO, M.E.; BERTELLI, A.A.E.; PELLEGGATTA, F.; FULGENZI, A.; CORSI, M.M.; BERTELLI, A. (1998). Phytoalexin resveratrol (3-4'-5-trihydroxystilbene) modulates granulocyte and monocyte endothelial adhesion. *Transplantation Proceedings*, 30, 4191-4193.
- FITZPATRICK, D.F.; HIRSCHFIELD, S.L.; COFFEY, R.G. (1993). Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am. J. Physiol.* 265, H774-H778.
- FLORES, J.; ARMIJO, J.A.; MEDIAVILLA, A. (1992). Farmacología humana. 2ªed. Ed. Masson-Salvat Medicina. Ediciones Científicas y Técnicas, S.A. Barcelona. pp 7-98.
- FORMICA, J.V.; REGELSON, W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Fd.Chem.Toxic.*, 33, 1061-1080.
- FRANKEL, E.N.; KANNER, J.; GERMAN, J.B.; PARKS, E.; KINSELLA, J.E. (1993). Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet*, 341, 454-457.
- FRANKEL, E.N.; WATERHOUSE, A.L.; TEISSEDRE, P.L. (1995). Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 890-894.
- FRANKEL, E.N.; BOSANEK, C.A.; MEYER, A.S.; SILLIMAN, K.; KIRK, L.L. (1998). Commercial grape juices inhibit the in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 834-838.
- FRÉMONT, L.; BELGUENDOZ, L.; DELPAL, S. (1999). Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Sciences*, 64, 2511-2521.
- FRÉMONT, L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*, 66, 663-673.
- GAZIANO, M. (2000). Dietary antioxidants and cardiovascular disease. *Vitamins and Hormones*, 58, 299-319.
- GIACHETTI, C.; TOGNOLO, C.; GNEMI, P.; TENCONI, A. (1999). Simultaneous determination of trans- and cis-resveratrol in spiked plasma by high-performance liquid chromatography with photo-diode array UV-vis and fluorimetric detection. *Chromatographia*, 50, 571-577.

- GIL-IZQUIERDO, A.; GIL, M.I.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. (2001). In vitro availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1035-1041.
- GOLDBERG, D.M. (1995). Does wine work? *Clinical Chemistry*, 41, 14-16.
- GOLDBERG, D.M.; YAN, J.; NG, E.; DIAMANDIS, E.P.; KARUMANCHIRI, A.; SOLEAS, G.J.; WATERHOUSE, A.L. (1994). Direct injection gas chromatographic mass spectrometric assay for trans-resveratrol. *Analytical Chemistry*, 66, 3959-3963.
- GOLDBERG, D.M.; KARUMANCHIRI, A.; NG, E.; YAN, J.; DIAMANDIS, E.P.; SOLEAS, G.J. (1995). Direct gas chromatographic-mass spectrometric method to assay cis-resveratrol in wines: preliminary survey of its concentration in commercial wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1245-1250.
- GOLDBERG, D.M.; TSANG, E.; KARUMANCHIRI, A.; DIAMANDIS, E.P. (1996). Method to assay the concentrations of phenolic constituents of biological interest in wines. *Analytical Chemistry*, 68, 1688-1694.
- GOLDBERG, D.M.; SOLEAS, G.J.; HAHN, S.E.; DIAMANDIS, E.P.; KARUMANCHIRI, A. (1997). Identification and assay of trihydroxystilbenes in wine and their biological properties. In Watkins, T.R. (Ed.), *Wine nutritional and therapeutic benefits* (pp. 24-43). Washington: American Chemical Society.
- GOLDBERG, D.M.; SOLEAS, G.J.; LEVESQUE, M. (1999). Moderate alcohol consumption: the gentle face of Janus. *Clinical Biochemistry*, 32, 505-518.
- GRONBAEK, M., BECKER, U., JOHANSEN, D., TONNESEN, H., JENSEN, G., SORENSEN, T. I. A. (1998). Population based cohort study of the association between alcohol intake and cancer of the upper digestive tract. *British Med. J.* 317, 844-848.
- GROENBAEK M., BECKER U., JOHANSEN D. TONNESEN, H., JENSEN, G., SORENSEN, T. I. A. (2000). Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease and cancer. *Ann Intern Med*, 133, 411-419.
- GUGLER, R.; LESCHIK, M.; DENGLER, H J. (1975). Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 9, 229-234.
- GUYTON, A.C.M.D.; HALL, J.E.P.H.D. Tratado de Fisiología Médica. 1997. 9ª edición. Interamericana Mc Graw-Hill; Healthcare group. México. Mc Graw-Hill Interamericana Editores, S.A.
- HACKKET, A.M. (1986). The metabolism of flavonoids compounds in mammals."Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological and structure activity relationships". Eds. Cody, V.; Middlenton, E. y Harbone, J.B. New York. 177-1974.

- HARADA, M.; KAN, Y.; NAOKI, H.; FUKUI, Y.; KAGEYAMA, N.; NAKAI, M.; MIKI, W.; KISO, Y. (1999). Identification of the Major Antioxidative Metabolites in Biological Fluids of the Rat with Ingested (+)-Catechin and (-)-Epicatechin. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 63, 973-977.
- HERTOG, M.G.; FESKENS, E.J.M.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B.; KROMHOUT, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and the risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *The Lancet* 342, 1007-1011.
- HERTOG, M.G.; KROMHOUT, D.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H.; BUZINA, R.; FIDANZA, F.; GIAMPAOLI, S.; JANSEN, A.; MENOTTI, A.; NEDELJKOVIC, S.; PEKKARINEN, M.; SIMIC, B.S.; TOSHIMA, H.; FESKENS, E.J.M.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. (1995). Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch. Intern. Med.* 155, 381-386.
- HO, Y.; LEE, Y.L.; HSU, K.Y. (1995). Determination of (+)-catechin in plasma by high-performance liquid chromatography using fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 665, 383-389.
- HOFFMEISTER, H.; SCHELP, F.-P.; MENSINK, G.B.M.; DIETZ, E.; BOHNING, D. (1999). The relationship between alcohol consumption, health indicators and mortality in the German population. *International Journal of Epidemiology*, 28, 1066-1072.
- HOLLMAN, P.C.H.; de VRIES, J.H.M.; van LEEUWEN, S.D.; MENGELERS, M.J.B.; KATAN, M.B. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.*, 62, 1276-1282.
- HOLLMAN, P.C.H.; GAAG, M.V.D.; MENGELERS, M.J.B.; van TRIJP, J.M.P.; de VRIES, J.H.M.; KATAN, M.B. (1996a). Absorption and disposition kinetics of dietary antioxidant quercetin in man. *Free Rad. Biol. Med.*, 21, 703-707.
- HOLLMAN, P.C.H., van TRIJP, J.M.P.; BUYSMAN, M.N.C.P. (1996b). Fluorescence detection of flavonols in HPLC by postcolumn chelation with aluminum. *Analytical Chemistry*, 68, 3511-3515.
- HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. (1997). Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry*, 57, 43-46.
- HOLLMAN, P.C.H.; van TRIJP, J.M.P.; BUYSMAN, M.N.C.P.; GAAG, M.V.D.; MENGELERS, M.J.B.; de VRIES, J.H.M.; KATAN, M.B. (1997). Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Letters*, 418, 152-156.
- HOLLMAN, P.C.H.; ARTS (2000). Review Flavonols, flavones and flavanols-nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1081-1093.

- HUBER, L. (1998). Validation of analytical methods: review and strategy. *LC GC International*, February, 96-105.
- HUSSAIN, S.R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. (1987). Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry* 26, 2489-2491.
- JACOB, R.A. (1999). Evidence that diet modification reduces in vivo oxidant damage. *Nutrition Reviews*, 57, 255-258.
- JANG, D.S.; KANG, B.S.; RYU, S.Y.; CHANG, I.M.; MIN, K.R.; KIM, Y. (1999). Inhibitory effects of resveratrol analogs on unopsonized zymosan-induced oxygen radical production. *Biochemical Pharmacology*, 57, 705-712.
- JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G.O.; SLOWING, K.V.; THOMAS, C.F.; BEECHER, C.W.W.; FONG, H.H.S.; FARNSWORTH, N.R.; KINGHORN, A.D.; MEHTA, R.G.; MOON, R.C.; PEZZUTO, J.M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275, 218-220.
- JAYATILAKE, G.S.; JAYASURIYA, H.; LEE, E.S.; KOONCHANOK, N.M.; GEAHLEN, R.L.; ASHENDEL, C.L.; McLAUGHLIN, J.L.; CHANG, C.J. (1993). Kinase inhibitors from *Polygonum culpidatum*. *J. Nat. Prod.* 56, 1805.
- JEANDET, P.; BESSIS, R.; MAUME, B.F.; SBAGHI, M. (1993). Analysis of resveratrol in Burgundy wines. *J. Wine Research*, 4, 79-85.
- JEANDET, P.; BESSIS, R.; MAUME, B.F.; MEUNIER, P.; PEYRON, D.; TROLLAT, P. (1995a). Effect of enological practices on the resveratrol isomer content of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 316-319.
- JEANDET, P.; BESSIS, R.; SBAGHI, M.; MEUNIER, P.; TROLLAT, P. (1995b). Resveratrol content of wines of different ages: relationship with fungal disease pressure in the vineyard. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 1-4.
- JEANDET, P.; BREUIL, A.C.; ADRIAN, M.; WESTON, L.A.; DEBORD, S.; MEUNIER, P.; MAUME, G.; BESSIS, R. (1997). HPLC analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode array detection and fluorometry. *Analytical Chemistry*, 69, 5172-5177.
- JUAN, M.E.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M.; de la TORRE-BORONAT, M.C.; PLANAS, J.M. (1999). Determination of trans-resveratrol in plasma by HPLC. *Analytical Chemistry*, 71, 747-750.
- KANNER, J.; FRANKEL, E.N.; GRANIT, R.; GERMAN, B.; KINSELLA, J.E. (1994). Natural antioxidants in grapes and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 64-69.
- KEHRER, J.P. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 23, 21-48.

- KIECHL, S.; WILLEIT, J.; POEWE, W.; EGGER, G.; OBERHOLLENZER, F.; MUGGEO, M. (1996). Insulin sensitivity and regular alcohol consumption: large, prospective, cross sectional population study (Bruneck study). *BMJ*, 313: 1040-1044
- KIMURA, Y.; OHMINAMI, H.; OKUDA, H.; BABA, K.; KOZAWA, M.; ARICHI, S. (1983). Effects of stilbene components of roots of polygonum ssp. on liver injury in peroxidized oil-fed rats. *J. Med. Plant Res*, 49, 51-54.
- KIMURA, Y.; OKUDA, H.; ARICHI, S. (1985). Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 834, 275.
- KINSELLA, J.E.; FRANKEL, E.; GERMAN, B.; KANNER, J. (1993). Possible mechanisms for the role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology*, abril 1993, 85-89.
- KLATSKY, A.L.; ARMSTRONG, M.A.; FRIEDMAN, G.D. (1990). Risk of cardiovascular mortality in alcohol drinkers, exdrinkers and nondrinkers. *Am. J. Cardiol.* 66, 1237-1242.
- KLATSKY, A.L.; ARMSTRONG, M.A. (1993). Alcoholic beverage choice and risk of coronary artery disease mortality: do red wine drinkers fare best? *Am. J. Card.* 71, 467.
- KUHNAU, J. (1976). The flavonoids: A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.*, 24, 117-191.
- LAMIKANRA, O.; GRIMM, C.C.; RODIN, J.B.; INYANG, I.D. (1996). Hydroxylated stilbenes in selected American wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1111-1115.
- LAMUELA-RAVENTÓS, R.M.; WATERHOUSE, A.L. (1993). Occurrence of resveratrol in selected California wines by a new HPLC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 521-523.
- LAMUELA-RAVENTÓS, R.M.; ROMERO-PÉREZ, A.I.; WATERHOUSE, A.L.; DE LA TORRE-BORONAT, M.C. (1995). Direct HPLC analysis of cis- and trans-resveratrol and piceid isomers in Spanish red *Vitis vinifera* wines. *ACS*, 43.
- LAMUELA-RAVENTÓS, R.M.; COVAS, M.I.; FITÓ, M.; MARRUGAT, J.; TORRE-BORONAT, M.C. (1999). Detection of dietary Antioxidant Phenolic Compounds in Human LDL. *Clinical Chemistry*, 45, 1870-1872.
- LANGCAKE, P. (1981). Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, ϵ -viniferin, α -viniferin and pterostilbene. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 18, 226.
- LANGCAKE, P.; MCCARTHY, W.V. (1979). The relationship of resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. *Vitis*, 18, 244-253.

- LANGCAKE, P.; PRYCE, R.J. (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 9, 77-86.
- LANGCAKE, P.; PRYCE, R.J. (1977). The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry*, 16, 1193-1196.
- LAPIDOT, T.; HAREL, S.; GRANIT, R.; KANNER, J. (1998). Bioavailability of red wine anthocyanins as detected in human urine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4297-4302.
- LAZARUS, N. B.; KAPLAN, G. A.; COHEN, R.D.; DIIN-JEN, L. (1991). Change in alcohol consumption and risk of death from all causes and from ischaemic heart disease. *Br. Med. J.* 303, 553-556.
- LEA, A.G.H.; ARNOLD, G.M. (1978). The phenolics of cider: bitterness and astringency. *J. Sci. Food Agric.* 29, 478-483.
- LEE, M.J.; WANG, Z.Y.; LI, H.; CHEN, L.; SUN, Y.; GOBBO, S.; BALENTINE, D.A.; YANG, C.S. (1995). Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 4, 393-399.
- MAESTRO-DURÁN, R.; LEÓN, R.; RUIZ-GUTIÉRREZ, V. (1993). Los compuestos fenólicos en la autodefensa de los vegetales. *Grasas y Aceites* 44(6), 365-369.
- MANACH, C.; MORAND, C.; TEXIER, O.; FAVIER, M.L.; AGULLO, G.; DEMIGNÉ, C.; RÉGÉRAT, F.; RÉMÉSY, C. (1995). Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *Nutrient Metabolism*, 1911-1922.
- MANACH, C.; TEXIER, O.; RÉGÉRAT, F.; AGULLO, G.; DEMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C. (1996). Bioavailability, metabolism and biological impact of 4-oxaflavonoids. *Nutr. Res.*, 16, 517-544.
- MANACH, C.; MORAND, C.; DEMIGNÉ, C.; TEXIER, O.; RÉGÉRAT, F.; RÉMÉSY, C. (1997). Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Lett.*, 409, 12-16.
- MANGIAPANE, H.; THOMPSON, J.; BROWN, S.; BELL, G.D.; WHITE, D.A. (1992). The inhibition of LDL oxidation by catechin a naturally occurring flavonoid. *Biochem. Pharm.* 43, 445-452.
- MARMOT, M.G.; SHIPLEY, M.J.; ROSE, G.; THOMAS, B.J. (1981). Alcohol and mortality: an U-shaped curve. *The Lancet* 1, 580-583.
- MARNETT, L.J.; HURD, H.K.; HOLLSTEIN, M.C.; LEVIN, D.E.; ESTERBAUER, H.; AMES, B.N. (1985). Naturally occurring carbonyl compounds are mutagens in *Salmonella* tester strain TA104. *Mutat. Res.* 148, 25-34.

- MARTÍNEZ-ORTEGA, M.V. (1997). Niveles de resveratrol en vinos andaluces. Tesis de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.
- MARTÍNEZ-ORTEGA, M.V.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. (2000a). Factores que afectan a los niveles de resveratrol en el vino. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 2, 113-118.
- MARTÍNEZ-ORTEGA, M.V.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. (2000b). Resveratrol content in wines and musts from the south of Spain. *Nahrung*, in press.
- MARTÍNEZ-ORTEGA, M.V.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. (2001). Changes in phenolic composition of wines submitted to in vitro dissolution tests. *Food Chemistry*, 73, 11-16.
- MATTIVI, F. (1993). Il contenuto di resveratrolo nei vini rossi e rosati trentini del commercio. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, Anno XLVI, 37-45.
- MATTIVI, F.; NICOLINI, G. (1993). Influenza della tecnica di vinificazione sul contenuto di resveratrolo dei vini. *L'Enotecnico*, Luglio/Agosto, 81-88.
- MATTIVI, F.; RENIERO, F.; KORHAMMER, S. (1995). Isolation, characterization, and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1820-1823.
- MAXWELL, S.; CRUICKSHANK, A.; THORPE, G. (1994). Red wine and antioxidant activity in serum. *The Lancet* 344, 193-194.
- McMURTREY, K.D. (1997). Resveratrol in wine. In Watkins, T.R. (Ed.), *Wine nutritional and therapeutic benefits* (pp. 44-55). Washington: American Chemical Society.
- McMURTREY, K.D.; MINN, J.; POBANZ, K.; SCHULTZ, T.P. (1994). Analysis of wines for resveratrol using direct injection high-pressure liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2077-2080.
- MEADE, T.W.; CHAKRABARTI, R.; HAINES, A.P.; NORTH, W.R.S.; STIRLING, Y. (1979). Characteristic affecting fibrinolytic activity and plasma fibrinogen concentrations. *British Med. J.* 1, 153-160.
- MEADE, T.W.; IMESON, J.; STIRLING, Y. (1987). Effects of changes in smoking and other characteristics on clotting factors and the risk of ischaemic heart disease. *Lancet*, 2: 986-988
- MEYER, A.S.; YI, O.S.; PEARSON, D.A.; WATERHOUSE, A.L.; FRANKEL, E.N. (1997). Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1638-1643.

- MILLER, D.D.; SCHRICKER, B.R.; RASMUSSEN, R.R.; van CAMPEN, D. (1981). An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *Am.J.Clin.Nutr.*, 34, 2248-2256.
- MILLER, J.C.; MILLER, J.N. Statistics for analytical chemistry. Ed. Ellis Horwood Limited. Chichester. Reino Unido 1993
- MILOSO, M.; BERTELLI, A.A.E.; NICOLINI, G.; TREDICI, G. (1999). Resveratrol-induced activation of the mitogen-activated protein kinases, ERK1 and ERK2, in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuroscience Letters*, 264, 141-144.
- MOORE, R.D.; PEARSON, T.A. (1986). Moderate alcohol consumption and coronary artery disease. *Medicine (Baltimore)* 65, 242-267.
- MORONEY, M.A.; ALCARAZ, M.J.; FORDER, R.A. (1988). Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *J. Pharm. Pharmacol.* 40, 787-792.
- MORRICE, PH.C.; WOOD, S.G.; DUTHIE, G.G. (2000). High-performance liquid chromatographic determination of quercetin and isorhamnetin in rat tissues using beta-glucuronidase and acid hydrolysis. *Journal of Chromatography B*, 738, 413-417.
- MOZZON, M.; FREGA, N.; PALLOTTA, U. (1996). Resveratrol content in some Tuscan wines. *Ital.J.Food Sci.*, 2, 145-152.
- OBISESAN, T.O.; HIRSCH, R.; KOSOKO, O. (1998). Moderate wine consumption is associated with decrease odds of developing age-related macular degeneration in NHANES-1. *J. Am. Geriatr. Soc.* 46, 1-7.
- ORSINI, F.; PELIZZONI, F.; VEROTTA, L.; ABURJAI, T. (1997). Isolation, synthesis, and antiplatelet aggregation activity of resveratrol 3-O-B-glucopyranoside and related compounds. *Journal of Natural Products*, 60, 1082-1087.
- OSMAN, H.E.; MAALEJ, N.; SHANMUGANAYAGAM, D.; FOLTS, J.D. (1998). Grape juice but not orange or grapefruit juice inhibits platelet activity in dogs and monkeys (*Macaca fascicularis*). *Journal of Nutrition*, 128, 2307-2312.
- PACE-ASCIAK, C.R.; ROUNOVA, O.; HAHN, S.E.; DIAMANDIS, E.P.; GOLDBERG, D.M. (1996). Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. *Clinica Chimica Acta*, 246, 163-182.
- PAGANGA, G.; RICE-EVANS, C.A. (1997). The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS Letters*, 401, 78-82.
- PEÑA, A., HERNÁNDEZ, T., ESTRELLA, I., AND SUAREZ, J. A. Contenido de trans-resveratrol y glicósido de trans-resveratrol en vinos españoles. 1997. El

- Puerto de Santa María. Grupos de Investigación Enológica. Jornadas Científicas'97.
- PÉREZ-LLAMAS, F.; LARQUÉ, E.; MARÍN, J.F.; MARTÍNEZ, J.A.; LÓPEZ, M.J.; ZAMORA, S. (2000). Efecto de la hidrólisis de la proteína sobre la absorción in vitro de aminoácidos y minerales en fórmulas infantiles. *VII Reunión Científica de la SEN (Barcelona 2000)*.
- PEZET, R.; PONT, V.; CUENAT, P. (1994). Method to determine resveratrol and pterostilbene in grape berries and wines using high-performance liquid chromatography and highly sensitive fluorometric detection. *Journal of Chromatography A*, 663, 191-197.
- PEZET, R.; CUENAT, PH. (1996). Resveratrol in wine: extraction from skin during fermentation and post-fermentation standing of must from Gamay grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47, 287-290.
- PÉREZ-LLAMAS, F.; LARQUÉ, E.; MARÍN, J.F.; MARTÍNEZ, J.A.; LÓPEZ, M.J.; ZAMORA, S. (2000). Efecto de la hidrólisis de la proteína sobre la absorción in vitro de aminoácidos y minerales en fórmulas infantiles. *VII Reunión Científica de la SEN (Barcelona 2000)*.
- PIETTA, P.; SIMONETTI, P. (1999). Dietary flavonoids and interaction with physiologic antioxidants. Eds. Packer, L.; M. Hiramatsu,; T.Yoshikawa. "Antioxidant Food Supplements in Human Health". San Diego, California: Academic Press. 283-308
- PISKULA, M.K.; TERAQ, J. (1998a). Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J. Nutr.* 128, 1172-1178.
- PISKULA, M.K.; TERAQ, J. (1998b). Quercetin's solubility affects its accumulation in rat plasma after oral administration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4313-4317.
- POWELL, J.J.; BURDEN, T.J.; THOMPSON, R.P.H. (1998). In vitro mineral availability from digested tea: a rich dietary source of manganese. *Analyst*, 123, 1721-1724.
- PRASONGSIDH, B.C.; SKURRAY, G.R. (1998). Capillary electrophoresis analysis of trans- and cis-resveratrol, quercetin, catechin and gallic acid in wine. *Food Chemistry*, 62, 355-358.
- RAND, M.L.; GROSS, P.L.; JAKOWEC, D.M.; PACKHAM, M.A.; MUSTARD, J.F. (1989). In vitro effects of ethanol on rabbit platelet aggregation, secretion of granule contents, and cyclic AMP levels in the presence of prostacyclin. *Thromb Haemostasis* 1989; 61: 254-258.
- RANKIN, S.; DE WHALLEY, C.V.; HOULT, R.S.; JESSUP, W.; WILKINS, G.M.; COLLARD, J.; LEAKE, D.S. (1993). The modification of low density lipoprotein by the flavonoids myricetin and gossypetin. *Biochem. Pharmacol.* 45, 67-69.

- RENAUD, S.; BESWICK, A.D.; FEHLY, A.M.; SHARP, D.S.; ELWOOD, P.C. (1992). Alcohol and platelet aggregation: the Caerphilly collaborative heart disease study. *Am. J. Clin. Nutr.* 55, 1012-1017.
- RENAUD, S.; LORGERIL, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet* 339, 1523-1526.
- RENAUD, S.; GUEGUEN, R., SIEST, G., SALOMON, R. (1999). Wine, beer and mortality in middle-aged men from eastern France. *Archives of Internal Medicine* 159, 1865-1869.
- PEÑA A.; HERNÁNDEZ, T.; ESTRELLA, I.; SUAREZ, J.A. (1997). Contenido de trans-resveratrol y glicósido de trans-resveratrol en vinos españoles. Grupos de investigación enológica. Jornadas científicas. SesiónVI-1. El Puerto de Santa María 12-14 de Mayo de 1997.
- REPETTO, M. (1997). Toxicología. Ed. Díaz de Santos. Sevilla.
- RIBEIRO de LIMA, M.T.; WAFFO-TÉGUO, P.; TEISSEDE, P.L.; PUJOLAS, A.; VERCAUTEREN, J.; CABANIS, J.C.; MÉRILLON, J.M. (1999). Determination of stilbenes (trans-astringin, cis- and trans-piceid, and cis- and trans-resveratrol) in Portuguese wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2666-2670.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.
- RIMM, E.B.; GIOVANNUCCI, F.L.; WILLERT, W.C. et al. (1991). Prospective study of alcohol consumption and risk of coronary disease in men. *The Lancet* 338, 464-486.
- RIMM, E.B.; KLATSKY A.; GROBBEE D.; STAMPFER, M.J (1998). Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *JAMA*, 279, 359-364.
- RIMM, E.B.; WILLIAMS, P.; FOSHER, K.; CRIQUI, M.; STAMPFER, M.J. (1999). Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *B.M.J.*, 319, 1523-1528.
- ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66, 401-436.
- ROGGERO, J.P.; ARCHIER, P.; COEN, S. (1991). Wine phenolics analysis via direct injection:enhancement of the method. *Journal of Liquid Chromatography*, 14, 533-538.
- ROGGERO, J.P.; ARCHIER, P. (1994). Dosage du resvératrol et de l'un de ses glycosides dans les vins. *Sciences des Aliments*, 14, 99-107.

- ROGGERO, J.P.; GARCÍA-PARRILLA, M.C. (1995). Effects of ultraviolet irradiation on resveratrol and changes in resveratrol and various of its derivatives in the skins of ripening grapes. *Sciences des Aliments*, 15, 411-422.
- ROGGERO, J.P. (1996). Évolution des teneurs en resvératrol et en picéide dans des vins en cours de fermentation ou de vieillissement. Comparaison des cépages grenache et mourvèdre. *Sciences des Aliments* 16, 631-642.
- ROGGERO, J.P. (1997). Wine phenolics analysis via direct HPLC injection. *American Laboratory News*.
- ROMERO PÉREZ, A.I.; LAMUELA RAVENTÓS, R.M.; BUXADERAS, S.; DE LA TORRE-BORONAT, M.C. (1996a). Resveratrol and piceid as varietal markers of white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1975-1978.
- ROMERO PÉREZ, A.I.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M.; WATERHOUSE, A.L.; DE LA TORRE-BORONAT, M.C. (1996b). Levels of cis- and trans-resveratrol and their glucosides in white and rosé *Vitis vinifera* wines from Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2124-2128.
- ROMERO-PÉREZ, A.I.; IBERN-GÓMEZ, M.; LAMUELA RAVENTÓS, R.M.; DE LA TORRE-BORONAT, M.C. (1999). Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1533-1536.
- ROTONDO, S.; RAJTAR, G.; MANARINI, S.; CELARDO, A.; ROTILIO, D.; DE GAETANO, G.; EVANGELISTA, V.; CERLETTI, C. (1998). Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. *Br.J.Pharmacology*, 123, 1691-1699.
- RUIDAVETS, J.B.; TEISSEDE, P.L.; FERRIÈRES, J.; CARANDO, S.; BOUGARD, G.; CABANIS, J.C. (2000). Catechin in the Mediterranean diet: vegetable, fruit or wine? *Atherosclerosis*, 153, 107-117.
- RUIZ-GUTIÉRREZ, V.; JUAN, M.E.; CERT, A.; PLANAS, J.M. (2000). Determination of Hydroxytyrosol in Plasma by HPLC. *Anal.Chem.*, 72, 4458-4461.
- SACK, M.N.; RADER, D.J.; CANNON, R.O. (1994). Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women. *The Lancet* 343, 269-270.
- SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. (2000). Review Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1094-1117.
- SATO, M.; RAMARATHNAM, N.; SUZUKI, Y.; OHKUBO, T.; TAKEUCHI, M.; OCHI, H. (1996). Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *J. Agric. Food Chem.* 44, 37-41.

- SATO, M.; SUZUKI, Y.; OKUDA, T.; YOKOTSUKA, K. (1997). Contents of resveratrol, piceid, and their isomers in commercially available wines made from grapes cultivated in Japan. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1800-1805.
- SAVOLAINEN, M.J.; KESANIEMI, Y.A. (1995). Effects of alcohol on lipoproteins in relation to coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol*, 6: 243-250
- SBAGHI, M.; JEANDET, P.; FAIVRE, B.; BESSIS, R.; FOURNIOUX, J.C. (1995). Development of methods using phytoalexin (resveratrol) assessment as a selection criterion to screen grapevine *in vitro* cultures for resistance to grey mould (*Botrytis cinerea*). *Euphytica*, 86, 41-47.
- SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *J.Nutr.*, 130, 2073S-2085S.
- SCHOENMAKERS, P.J. (1988). Optimization of chromatographic selectivity. pp 7. Elsevier. Amsterdam.
- SEIGNEUR, M.; BONNET, J.; DORIAN, B.; BENCHIMOL, D.; DROUILLET, F.; GOUVERNEUR, G.; LARRUE, J.; CROCKETT, R.; BOISSEAU, M.; RIBERAU-GAYON, P.; BRICAUD, H. (1990). Effect of the consumption of alcohol, white wine and red wine on platelet function and serum lipids. *J. Appl. Card.* 5 (4), 215-222.
- SERAFINI, M.; MAIANI, G.; FERRO-LUZZI, A. (1997). Effect of ethanol on red wine tannin-protein (BSA) interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3148-3151.
- SERRA-MAJEM, LI.; RIBAS, L.; TRESSERRAS, R.; NGO, J.; SALLERAS, LI. (1995). How could changes in diet explain changes in coronary heart disease mortality in Spain? The Spanish paradox. *Am. J. Clin. Nutr.* 61(suppl), 1351S-1359S.
- SIEMANN, E.H.; CREASY, L.L. (1992). Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43, 49-52.
- SINGLETON, V.L.; ESSAU, P. (1969). Quality and processing relationship in wine production. Phenolic substances in grapes and wines and their significance. *Ad. Food Res.* Academic Press, New York.
- SKOOG, D.A.; LEARY, J.J. (1980). Espectroscopía de fluorescencia, fosforescencia y quimioluminiscencia molecular. *Análisis Instrumental* 4^{ed}, 201-213 Ed. McGraw-Hill. Madrid.
- SOBOLEV, V.S.; COLE, R.J.; DORNER, J.W. (1995). Isolation, purification, and liquid chromatographic determination of stilbene phytoalexins in peanuts. *Journal of AOAC International*, 78, 117-1182.
- SOBOLEV, V.S.; COLE, R.J. (1999). Trans-resveratrol content in commercial peanuts and peanut products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1435-1439.

- SOLEAS, G.J.; GOLDBERG, D.M.; DIAMANDIS, E.P.; KARUMANCHIRI, A.; YAN, J.; NG, E. (1995). A derivatized gas chromatographic-mass spectrometric method for the analysis of both isomers of resveratrol in juice and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 346-352.
- SOLEAS, G.J.; GOLDBERG, D.M.; NG, E.; KARUMANCHIRI, A.; TSANG, E.; DIAMANDIS, E.P. (1997a). Comparative evaluation of four methods for assay of cis- and trans-resveratrol. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 169-176.
- SOLEAS, G.J.; TOMLINSON, G.; DIAMANDIS, E.P.; GOLDBERG, D.M. (1997b). Relative contributions of polyphenolic constituents to the antioxidant status of wines: development of a predictive model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3995-4003.
- SOMERS, T.C.; VERETTE, E.; POCOCK, F. (1987). Hydroxycinnamate esters of *Vitis vinifera*: White vinification, and effects of exogenous enzymic hydrolysis. *J. Sci. Food Agric.* 40, 67-78.
- SOTHEESWARAN, S.; PASUPATHY, V. (1993). Distribution of resveratrol oligomers in plants. *Phytochemistry* 32(5), 1083-1092.
- SPENCER, J.P.E.; CHAUDRY, F.; PANNALA, A.S.; SRAI, S.K.; DEBNAM, E.; RICE-EVANS, C. (2000). Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 272, 236-241.
- STACCHINI, A.; DRAISCI, R.; LUCENTINI, L. (1995). Principi attivi antiossidanti presenti nei vini. Commento ai dati recenti della letteratura. *La Rivista di Scienza dell Alimentazione* 24(3), 595-599.
- STAMPFER, M.J.; SACKS, F.M.; SALVINI, F.; WILLET, W.C.; HENNEKENS, C.H. (1991). A prospective study of cholesterol, apolipoproteins and the risk of myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 325, 373-381.
- STOCKLEY, C. S. (1995). El vino y la enfermedad cardiovascular. *Alimentaria*, Nov. 95, 131-136.
- STUBBS, C.D.; RUBIN, R. (1992). Effect of ethanol on platelet phospholipase A2. *Lipids*, 27: 255-260.
- TADOLINI, B.; JULIANO, C.; PIU, L.; FRANCONI, F. (2000). Resveratrol inhibition of lipid peroxidation. *Free Rad. Res.* , 33, 105-114.
- TALL, A.R. (1993). Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J. Lipid Res* 34, 1225-1274.
- TAMURA, G.; GOLD, C.; FERR-LUZI, A.; AMES, B.N. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4961.
- TEGUO, P. W.; DECENDIT, A.; VERCAUTEREN, J.; DEFFIEUX, G.; MÉRILLON, J.M. (1996a). Trans-resveratrol-3-O-beta- glucoside (pideid) in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Phytochemistry* 42(6), 1591-1593.

- TEGUO, P. W.; DECENDIT, A.; KRISA, S.; DEFFIEUX, G.; VERCAUTEREN, J.; MÉRILLON, J.M. (1996b). The accumulation of stilbene glycosides in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Journal of Natural Products*, 59, 1189-1191.
- TEGUO, P. W.; FAUCONNEAU, B.; DEFFIEUX, G.; HUGUET, F.; VERCAUTEREN, J.; MÉRILLON, J.M. (1998). Isolation, identification, and antioxidant activity of three stilbene glucosides newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures. *Journal of Natural Products*, 61, 655-657.
- TEISSEDRE, P.L.; FRANKEL, E.N.; WATERHOUSE, A.L.; PELEG, H.; GERMAN, B. (1996). Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *J.Sci.Food Agric.* 70, 61.
- TERAO, J. (1999). Dietary flavonoids as plasma antioxidants on lipid peroxidation: significance of metabolic conversion. In Packer, L., M.Hiramatsu, & T.Yoshikawa (Eds.), *Antioxidant Food Supplements in Human Health* (pp. 255-268). San Diego, California: Academic Press.
- THORTON, J.; SYMES, C.; HEATON, K. (1983). Moderate alcohol intake reduces bilecholesterol saturation and raises HDL cholesterol. *The Lancet* 2, 819-822.
- TICCA, M. (1995). Alimentazione equilibrata e salute: il ruolo del vino. *La Rivista di Scienza dell'Alimentazione*, anno 24 (3), 323-342.
- TJONNELAND A., GROENBAEK M., STRIPP C., OVERVAD K.: «Wine intake and diet in a random sample of 48.763 Danish men and women», *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 49-54.
- TOMERA, J.F. (1999). Current knowledge of the health benefits and disadvantages of wine consumption. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 129-138.
- TOREL, J.; CILLARD, J.; CILLARD, P. (1986). Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radicals. *Phytochemistry* 25, 383-385.
- TRESGUERRES et al., 1999. *Fisiología Humana*. 2ª Ed. Mc Graw-Hill Interamericana Editores
- UENO, I.; NAKAWA, N.; NIROMO, I.J. (1983). Metabolic fate of [¹⁴C] quercetin in the AC1 rat. *Japan J. Exp. Med.*, 53, 41-50.
- URSINI, F.; TUBARO, F.; RAPUZZI, P. (1997). *Vino e salute. Fondamenti della teoria basata sull'effetto antiossidante.*
- UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP 23), THE NATIONAL FORMULARY (NF 18) (1995). United States Pharmacopeial Convention.
- van GOLDE, P.H.M.; SLOOTS, L.M.; VERMEULEN, W.P. (1999). The role of alcohol in the anti low density lipoprotein oxidation activity of red wine. *Atherosclerosis*, 147, 365-370.

- VINSON, J.A.; DABBAGH, Y.A.; SERRY, M.M.; JANG, J. (1995a). Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2800-2802.
- VINSON, J.A.; JANG, J.; DABBAGH, Y.A.; SERRY, M.M.; CAI, S. (1995b). Plant polyphenols exhibit lipoprotein-bound antioxidant activity using an in vitro oxidation model for heart disease. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2798-2799.
- VIÑAS, P.; LÓPEZ-ERROZ, C.; MARÍN-HERNÁNDEZ, J.J.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. (2000). Determination of phenols in wines by liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 871, 85-93.
- VIRGILI, F.; PAGANGA, G.; BOURNE, L.C.; RIMBACH, G.; NATELLA, F.; RICE-EVANS, C.; PACKER, L. (2000). Ferulic acid excretion as a marker of consumption of a French maritime pine (*Pinus maritima*) bark extract. *Free Radical Biology & Medicine*, 28, 1249-1256.
- VRHOSEK, U.; EDER, R.; WENDELIN, S. (1995). The occurrence of trans-resveratrol in slovenian red and white wines. *Acta Alimentaria*, 24, 203-212.
- WATERHOUSE, A.L., LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. (1994). The occurrence of piccid, a stilbene glucoside, in grape berries. *Phytochemistry*, 37, 571-573.
- WILLIAMSON, G.; DAY, A.J.; PLUMB, G.W.; COUTEAU, D. (2000). Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochemical Society Transactions* 28 (2), 16-22.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Health statistics annual. Geneva: World Health Organization, 1989.
- YANG, C.S.; CHEN, L.; LEE, M.J.; BALENTINE, D.; KUO, M.C.; SCHANTZ, S.P. (1998). Blood and Urine Levels of Tea Catechins after Ingestion of Different Amounts of Green Tea by Human Volunteers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 7, 351-354.
- ZHU, Z.; KLIRONOMOS, G.; VACHEREAU, A.; NEIRINCK, L.; GOODMAN, D.W. (1999). Determination of trans-resveratrol in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 724, 389-392.

8. ANEXOS

ANEXO 1. ABREVIATURAS EMPLEADAS

AINES = antiinflamatorios no esteroideos

AOAC = Association of Official Analytical Chemists

CLAE = cromatografía líquida de alta eficacia

COX = ciclooxigenasa

DMPC = disolución de patrones muy concentrada

FDA = Food and Drug Administration

gl-t-Resv = glucósido de trans-resveratrol

gl-c-Resv = glucósido de cis-resveratrol

HDL = high density lipoprotein lipoproteínas de alta densidad

LDD = límite de detección

LDC = límite de cuantificación

LDL = low density lipoprotein, lipoproteínas de baja densidad

NO = óxido nítrico

OMS = Organización Mundial de la Salud

PCA = análisis de componentes principales

Resv = resveratrol

TL: = tiempo de latencia

USP = United States Pharmacopoeia Farmacopea Americana

VLDL = very low density lipoprotein, lipoproteínas de muy baja densidad

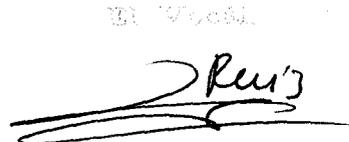
UNIVERSIDAD DE BILBAO

Resolución de la Junta de Gobierno de la Universidad de Bilbao, en virtud de la cual se concede el título de Doctor en Ciencias Exactas y Naturales a

D. MARÍA DEU VALLE MARTÍNEZ ORTEGA
por su tesis doctoral titulada: **ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS DEL VINO CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE. PUESTA A PUNTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA ESTUDIOS PREVIOS DE BIODISPONIBILIDAD.**

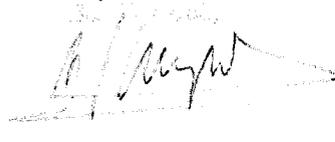
La Junta de Gobierno de la Universidad de Bilbao, en virtud de la cual se concede el título de Doctor en Ciencias Exactas y Naturales a

laureada por unanimidad.
Fecha: 14 de febrero de 2002

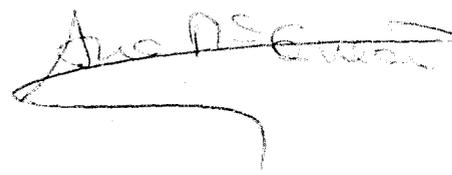

El Presidente

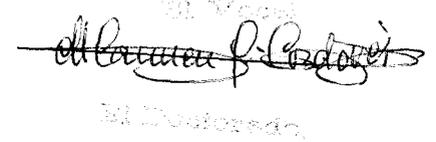
EL PRESIDENTE




El Secretario

El Secretario




El Doctorando

El Doctorando

