

ANÁLISIS DE COMPONENTES BIOACTIVOS DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS EN EL VINO

Analysis in Wine of Bioactive Compounds Derived of Amino Acids

Alejandro MARTÍN QUIJADA; Ana María GONZÁLEZ PARAMÁS; Celestino SANTOS BUELGA*

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Área de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno. 37007 Salamanca. España

Correo-e: csb@usal.es*

RESUMEN: Melatonina, tirosol e hidroxitirosol son sustancias bioactivas cuya presencia se ha descrito en el vino en baja concentración, lo que representa un reto para su análisis. El presente trabajo plantea la puesta a punto de un método para su determinación, mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a detección por espectrofotometría de diodos y espectrometría de masas (HPLC-DAD-MS) y su aplicación posterior para su análisis en muestras de diversos tipos de vinos.

Palabras clave: tirosol; hidroxitirosol; melatonina; vino; HPLC.

ABSTRACT: Melatonin, tyrosol and hydroxytyrosol are bioactive substances whose presence has been described in wine in low concentration, making their analysis challenging. The present work deals with the development of a method for their determination using high performance liquid chromatography coupled to double online detection by diode array spectrophotometry and mass spectrometry (HPLC-DAD-MS), which was further applied to their analysis in samples of different types of wines.

Keywords: tyrosol; hydroxytyrosol; melatonin; wine; HPLC.

1. INTRODUCCIÓN

El vino es una bebida obtenida por fermentación alcohólica de la uva (*Vitis vinifera* L.) por acción de levaduras, que transforman los azúcares naturales del fruto en etanol y dióxido de carbono. Agua, azúcares y ácidos orgánicos (málico y tartárico, principalmente) son los compuestos mayoritarios de la uva, pero existen también otros componentes importantes para las características del vino, como sustancias aromáticas y compuestos fenólicos, entre los que se encuentran los antocianos, responsables del color en los vinos tintos, o los taninos, que confieren características como la astringencia, el cuerpo o la capacidad para envejecer.

Además, tanto en la uva como en el vino se pueden encontrar aminoácidos libres y proteínas en baja concentración. Los aminoácidos de la uva son metabolizados total o parcialmente por las levaduras durante la fermentación, pero en contrapartida otros son excretados por las levaduras en la fase final de la fermentación o liberados posteriormente en la autólisis de estas; algunos son también producidos por degradación enzimática de las proteínas de la uva. Los aminoácidos libres (arginina, prolina, alanina, ácido glutámico, treonina, serina y ácido gamma-aminobutírico) de la uva son fuente de nitrógeno para las levaduras durante la fermentación y precursores de compuestos aromáticos que se forman durante esta (aldehídos, ésteres, etc.), teniendo un destacado impacto en las características organolépticas del vino. A partir de estos aminoácidos se forman también, en pequeña cantidad, productos como melatonina, tirosol o hidroxitirosol, particularmente interesantes por poseer propiedades bioactivas. Sin embargo, su detección y determinación en los vinos es complicada, debido a las bajas concentraciones en las que se encuentran (Fracassetti *et al.*, 2019).

La melatonina es una sustancia con actividad hormonal, presente en el organismo en concentraciones que varían de acuerdo al ciclo diurno/nocturno. En los seres humanos se sintetiza principalmente en la glándula pineal a partir del neurotransmisor serotonina y participa en una gran variedad de procesos celulares, neuroendocrinos y neurofisiológicos, como controlar el ciclo diario del sueño (Mercolini *et al.*, 2012).

El tirosol es un compuesto fenólico presente en una variedad de alimentos, como el aceite de oliva. Posee capacidad para proteger las células contra el daño oxidativo. Aunque no es tan potente como otros antioxidantes presentes en el aceite, su concentración más elevada y buena biodisponibilidad han llevado a proponer que puede contribuir de manera significativa a los beneficios para la salud asociados al consumo de aceite de oliva virgen (EFSA, 2011).

El hidroxitirosol se considera uno de los antioxidantes naturales más potentes después del ácido gálico, con una capacidad de captación de radicales del oxígeno (ORAC, *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) estimada de 40.000

$\mu\text{mol TE}^1/\text{g}$, dos veces mayor que la de la coenzima Q10. Se han descrito diversos efectos beneficiosos del hidroxitirosol, entre los que destacan el descenso en el riesgo cardiovascular, la prevención frente a ciertos tipos de cáncer, propiedades antiinflamatorias y antiviricas y mantenimiento de concentraciones normales de colesterol HDL en sangre y de la presión arterial (EFSA, 2011).

2. OBJETIVO

Teniendo en cuenta las propiedades bioactivas de melatonina, tirosol e hidroxitirosol y que su presencia en pequeñas cantidades se encuentra descrita en el vino, el objetivo del trabajo es la puesta a punto de un método analítico cuantitativo para su determinación mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a detección por espectrofotometría de diodos y espectrometría de masas. Una vez desarrollado el método, se procederá a aplicarlo analizando muestras de vinos.

3. MATERIALES

3.1. *Reactivos*

Ácido fórmico concentrado (Panreac), acetonitrilo LiChrosolv[®] (Supelco), patrones de tirosol, hidroxitirosol, melatonina y ácido anísico (Sigma-Aldrich).

3.2. *Material y equipos*

- Balanza analítica “Sartorius” Extend ED124S con aproximación de 0,1 mg.
- Sistema de purificación de agua ultrapura Direct-QTM “Millipore”.
- Baño ultrasonido “Branson” modelo 5510.
- Microcentrífuga “Thermo Scientific” Heraeus Fresco 17.
- Cartuchos de extracción en fase sólida Sep-Pak[®] de Waters.
- Equipo de cromatografía Agilent series 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.) provisto de bomba cuaternaria y detector de diodos (DAD), controlado por el software ChemStation (versión B.04.01) y acoplado a un espectrómetro de masas API 3200 Qtrap AB Sciex (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania; MDS Sciex), equipado con una sonda de ionización por electropulverización (Electrospray Ionization Probe, ESI) y un analizador de masas de triple cuadrupolo, controlado por el software Analyst 5.1.
- Equipo y material habitual de laboratorio.

1. Equivalentes de Trolox (TE), siendo el trolox un análogo hidrosoluble de la vitamina E.

3.3. Muestras

El análisis de los compuestos de interés se llevó a cabo en 19 muestras de vino, que incluyeron vinos blancos (n = 6) y tintos (n = 9) de diferentes zonas geográficas y denominaciones, así como vinos de Oporto (n = 4).

4. MÉTODOS

4.1. Preparación de las muestras

Como se indicará en la parte de resultados, se ensayaron varios métodos de preparación sin conseguir ninguno totalmente eficaz, por lo que se optó por la inyección directa de la muestra de vino, previa adición del patrón interno (ácido anísico) en concentración constante de 0,1 mg/mL. En concreto, se tomaban 450 µL de vino, a los que se añadían 50 µL de solución de ácido anísico (0,1 mg/mL) y se centrifugaba 1 min a 10000 rpm antes de su inyección en HPLC.

4.2. Análisis por HPLC-DAD-MS

Tras una serie de ensayos preliminares, las condiciones cromatográficas finalmente puestas a punto para el análisis de los compuestos de interés fueron las siguientes:

- Fase estacionaria: columna Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2,7 µm (4,6 mm x 150 mm), termostatzada a 35 °C.
- Fase móvil: ácido fórmico 0,1 % (eluyente A) y acetonitrilo:ácido fórmico (99,9:0,1) (eluyente B).
- Gradiente de elución: 100 % de A a 10 % de B en 5 minutos, 10 % a 15 % de B en 5 min, de 15 % a 35 % de B en 10 minutos, 35 % a 40 % de B en 20 min.
- Flujo: 0,7 mL/min.
- Volumen de inyección: 100 µL.

Se realizó una doble detección en línea por espectrofotometría de diodos, seleccionando como longitud de onda preferente 280 nm, y espectrometría de masas, operando en modo de ionización negativo a una temperatura de 550 °C y registrando las señales entre m/z 50 y m/z 250. Se utilizó aire Zero como gas nebulizador (35 psi) y gas turbo (550 °C, 35 psi) para el secado del eluyente, y nitrógeno como gas cortina (10 psi) y gas de colisión medio.

El método de detección de masas empleado fue un *full scan* a alta sensibilidad (*Enhanced MS*, EMS) seguido de *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) utilizando

un tiempo de transición de 150 milisegundos (*dwell time*). Los parámetros utilizados en ambos modos de detección fueron los siguientes: voltaje del capilar -4500 V, *declustering potential* (DP) -50 V, potencial de entrada (EP) -10.5 V; mientras que para la energía de colisión (CE) se fijaron -12 V en modo EMS y -20 V en modo MRM. Adicionalmente, en el modo *full scan* se definió 200 como valor de la lente de cuello (C2B) mientras que en el modo MRM se utilizó -3 V como valor para el parámetro *Collision Cell Exit Potential* (CXP).

La identificación y cuantificación de los compuestos se realizó con base en criterios de tiempos de retención y transiciones de masa seleccionadas (137 Da a 119 Da para tirosol, 153 Da a 123 Da para hidroxitirosol, 231 Da a 144 Da para melatonina y 151 Da a 107 Da para ácido anísico). La cuantificación se realizó por comparación de las áreas de los picos registrados para cada compuesto con rectas de calibrado de tirosol, hidroxitirosol y melatonina (0,0625 mg/L a 2 mg/L) preparadas en ácido fórmico 0,1 %:metanol (90:10). Como patrón interno se empleó ácido anísico, en una concentración final constante de 0,1 mg/mL.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el desarrollo del método cromatográfico se llevó a cabo inicialmente una búsqueda bibliográfica de métodos descritos en la literatura para la determinación cuantitativa de tirosol, hidroxitirosol y melatonina en vino. La mayoría de autores empleaban cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) como método de separación, acoplada a detección por fluorescencia. Tan solo se encontró un método en el que, además de fluorescencia, se utilizaba detección UV para tirosol e hidroxitirosol (Piñeiro *et al.*, 2011).

En el laboratorio no se disponía de detector de fluorescencia por lo que se decidió probar la detección y cuantificación fotométrica en el UV. Se comenzó por utilizar las condiciones descritas en la bibliografía por Piñeiro *et al.* (2011) utilizando patrones individuales de los compuestos objeto de estudio. Se comprobó que se conseguía una buena separación y resolución de los tres compuestos, así como una correcta detección basándose en sus tiempos de retención y espectros UV. Sin embargo, al analizar las muestras de vino (Figura 1), la complejidad de la matriz impedía la adecuada detección de los compuestos, puesto que eluían a tiempos de retención idénticos a otros compuestos presentes en los vinos en mayor concentración o con mayores extinciones. Resultados similares se obtuvieron cuando se llevaba a cabo una etapa previa de purificación, utilizando un cartucho de fase reversa C18 (Sep-Pak®) para separar algunos de los posibles interferentes.

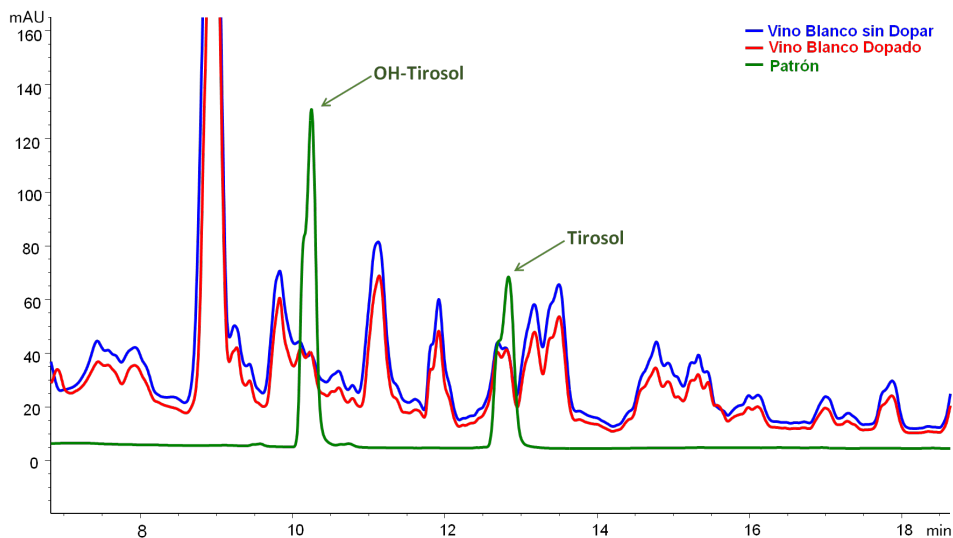


Figura 1. Cromatogramas superpuestos de una solución de patrones de tirosol e hidroxitirosol (OH-Tir) (0,1 mg/mL), una muestra de vino blanco y otra del mismo vino al que se habían añadido los compuestos patrón (concentración final 0,01 mg/mL).

Se procedió entonces a ensayar un método mediante espectrometría de masas que permitiese la detección y la cuantificación inequívocas de los compuestos objeto de estudio. La utilización de la espectrometría de masas con fines cuantitativos hacía necesario el empleo de un patrón interno, para soslayar la variabilidad de respuesta inter- e intradía del método. En bibliografía se recogen como posibles patrones internos triptófano deuterado (Álvarez *et al.*, 2020) y 8-hidroximirtzapina (Mercolini *et al.*, 2012), sin embargo, se optó por emplear ácido anísico, un ácido fenólico cuya presencia no está descrita en vinos, ya que ofrecía una respuesta similar y su tiempo de retención no interfería con la determinación de tirosol, hidroxitirosol y melatonina.

Por otra parte, teniendo en cuenta la complejidad de la matriz y la existencia de sustancias de pesos moleculares similares a los compuestos a analizar, se decidió recurrir a un método de masas basado en transiciones de masa en lugar de la detección de los pseudoiones moleculares, monitorizando la fragmentación característica de cada compuesto, lo que permitía su identificación y cuantificación específicas. La cuantificación se llevó a cabo a partir de las áreas de los picos registrados en los cromatogramas de masas, considerando el tiempo de retención y la intensidad de la transición seleccionada. En la Figura 2 se muestran cromatogramas con los picos de cada uno de los compuestos y del patrón interno.

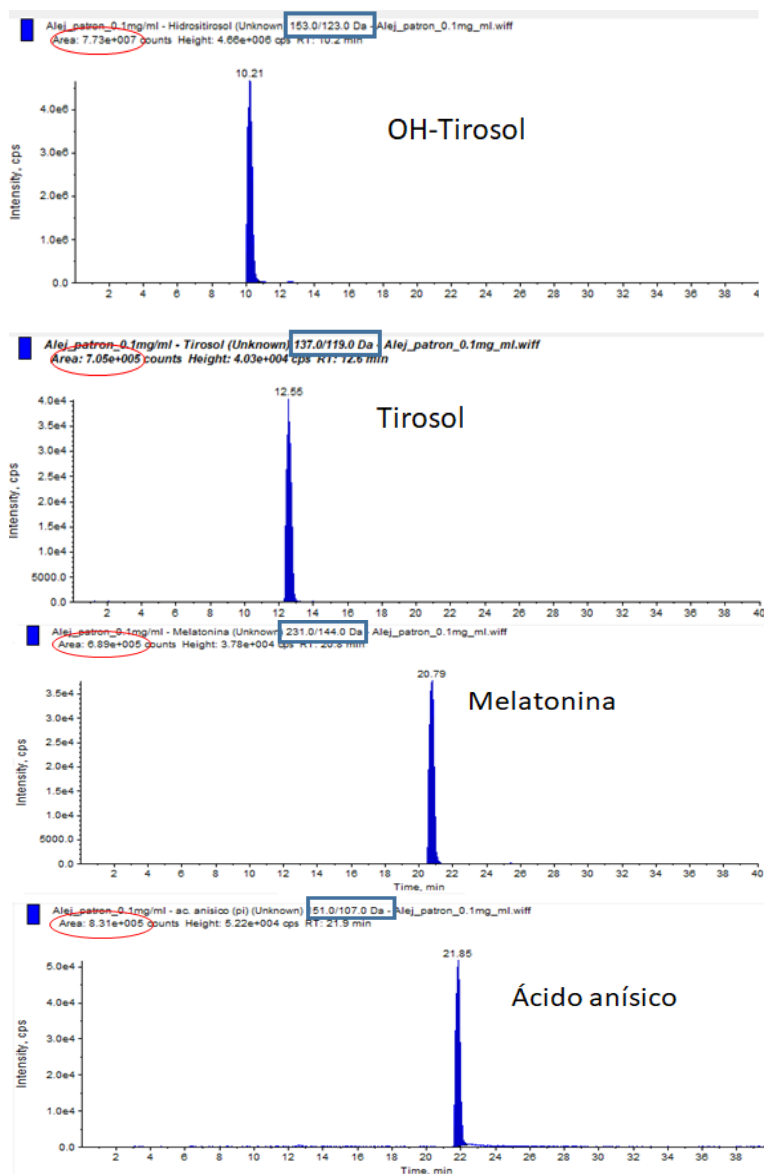


Figura 2. Ejemplo de cromatogramas obtenidos para tirosol, hidroxitirosol, melatonina y ácido anísico utilizando las transiciones de masas seleccionadas (recuadro azul). En el óvalo rojo se muestran las áreas de los picos correspondientes a una concentración de 0,1 mg/mL.

Para el método optimizado se realizaron rectas de calibrado en el intervalo de concentraciones indicado en el apartado de métodos, representando concentración del compuesto frente a la relación área del compuesto/área del patrón interno, para cada uno de los tres compuestos considerados. Las ecuaciones de las rectas fueron las siguientes:

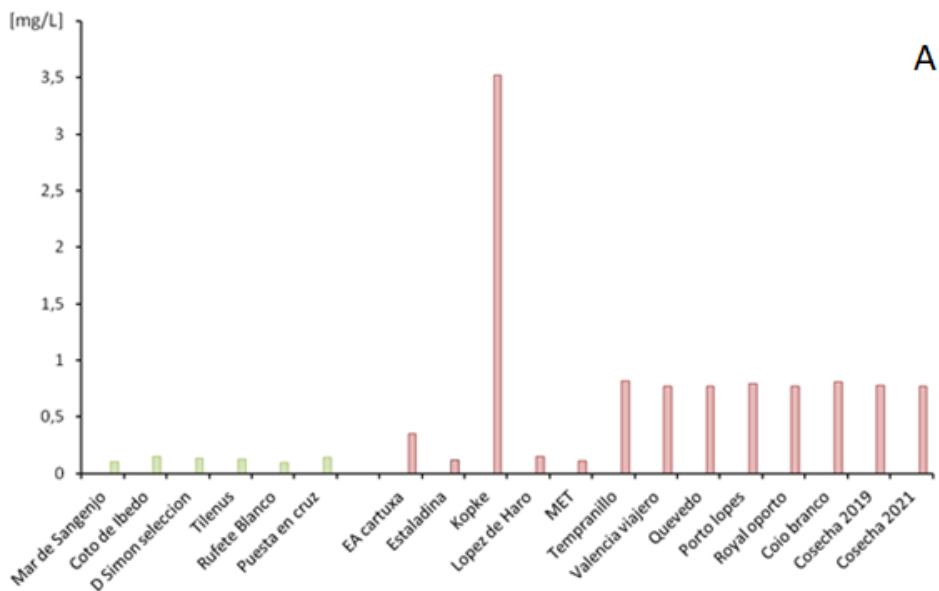
$$\text{Tirosol: } y = 52,085x - 0,0047$$

$$\text{Hidroxitirosol: } y = 21266x - 0,1459$$

$$\text{Melatonina: } y = 113,69x - 0,0024$$

En todos los casos el coeficiente de determinación fue superior a 0,99.

Posteriormente, se procedió a analizar los compuestos de interés en 19 muestras de vino de diferente tipo y origen (Figura 3). El compuesto presente en mayor concentración en todas las muestras fue el tirosol (contenidos entre 0,093 y 3,52 mg/L), seguido a distancia por el hidroxitirosol (0,007-0,108 mg/L), mientras que la melatonina se detectó solo en algunas muestras, pero en niveles que estaban en la mayor parte de los casos cercanas o por debajo del límite de cuantificación calculado para el compuesto en el método utilizado (17,6 µg/L). Otros autores que han analizado estos compuestos indican igualmente la presencia mayoritaria de tirosol (Bordiga *et al.*, 2016).



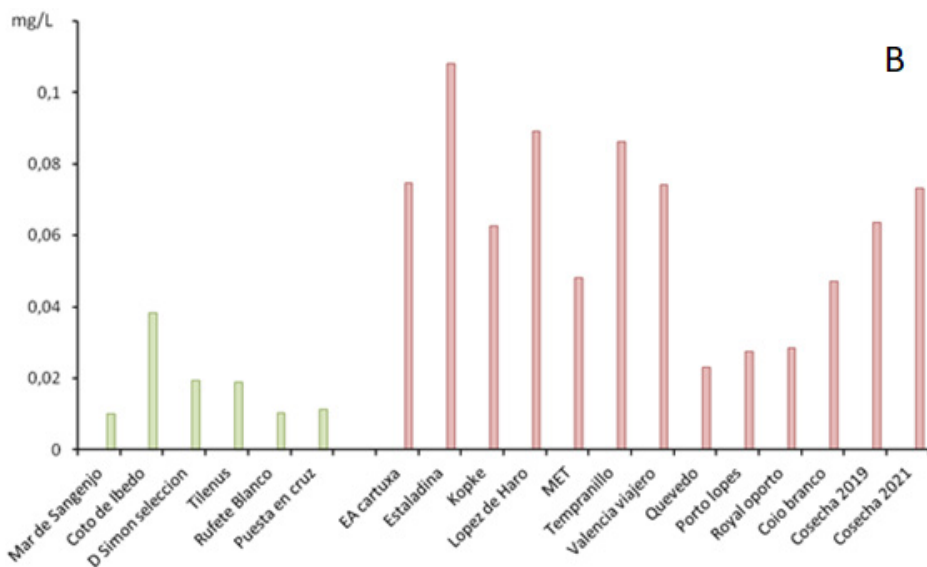


Figura 3. Comparación de las concentraciones de tirosol (A) e hidroxitirosol (B) determinadas en los vinos blancos (barras de color verde) y tintos (barras rojas) analizados.

En general, los contenidos determinados en nuestro caso fueron inferiores a los encontrados por otros autores. Sin embargo, hay que tener en cuenta que para los mismos se recoge una gran variabilidad de resultados en la bibliografía, atribuida a la influencia de factores como temperatura, disponibilidad de nitrógeno o contenido de azúcares sobre la actividad de las levaduras durante el proceso de fermentación (Piñeiro *et al.*, 2011). Los valores descritos por otros autores (Albu *et al.*, 2020; Bocalandro *et al.*, 2011; Bordiga *et al.*, 2016; Carneiro *et al.*, 2020; Fracassetti *et al.*, 2019; Mercolini *et al.*, 2012; Piñeiro *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2020) oscilan dentro de los siguientes límites:

- Tirosol: 0,1 a 44,46 mg/L
- Hidroxitirosol: 0,071 a 9,2 mg/L
- Melatonina: 0,05 a 423 µg/L

En las muestras analizadas en nuestro caso, se observó una notable diferencia de contenidos entre vinos blancos y tintos, con concentraciones en estos últimos entre 6-7 veces más elevadas de tirosol (Figura 3 A) y 3-4 veces más elevadas de hidroxitirosol (Figura 3 B). Destaca especialmente el valor de tirosol encontrado en una de las muestras de vino de Oporto, que no se cree que pueda atribuirse a esta categoría de vinos, ya que en los otros tres vinos analizados del mismo tipo

no se encontraron valores tan altos. En cualquier caso, sería necesario analizar más muestras de diferentes tipos, orígenes y edad para obtener conclusiones que pudieran tener un carácter más general.

6. CONCLUSIONES

1. El método cromatográfico puesto a punto ofrece buena resolución, pero la detección por espectrofotometría UV no permite una correcta detección y cuantificación de tirosol, hidroxitirosol y melatonina en los vinos debido a sus bajas concentraciones y la complejidad de la matriz, con diversas sustancias solapadas a los mismos tiempos de retención.

2. Los problemas para la detección y cuantificación selectiva de los compuestos de interés se pudieron resolver mediante la utilización de la espectrometría de masas utilizando un método desarrollado al efecto, basado en el empleo de transiciones de masa, utilizando el modo MRM, y de un patrón interno (ácido anísico) para normalizar las variaciones de las señales de una inyección a otra.

3. En las muestras de vino analizadas, las concentraciones determinadas de tirosol e hidroxitirosol fueron generalmente inferiores o similares a las encontradas por otros autores en vinos de distinto origen. En cualquier caso, al igual que otros autores, en las muestras analizadas el contenido de tirosol fue siempre mayor que el de hidroxitirosol. Por otra parte, las concentraciones de tirosol e hidroxitirosol fueron superiores en vinos tintos que en vinos blancos. La melatonina se encontró siempre en concentraciones muy bajas, en torno al límite de cuantificación del método.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Albu C, Radu LE, Radu GL. Assessment of Melatonin and Its Precursors Content by a HPLC-MS/MS Method from Different Romanian Wines. *ACS Omega*. 2020; 5(42):27254-27260.
- Álvarez-Fernández MA, Carafa I, Vrhovsek U, Arapitsas P. Modulating Wine Aromatic Amino Acid Catabolites by Using *Torulasporea delbrueckii* in Sequentially Inoculated Fermentations or *Saccharomyces cerevisiae* Alone. *Microorganisms*. 2020; 8(9):1349.
- Boccalandro HE, González CV, Wunderlin DA, Silva MF. Melatonin levels, determined by LC-ESI-MS/MS, fluctuate during the day/night cycle in *Vitis vinifera* cv Malbec: evidence of its antioxidant role in fruits. *J Pineal Res*. 2011; 51(2):226-232.
- Bordiga M, Lorenzo C, Pardo F, Salinas MR, Travaglia F, Arlorio M, Coisson JD, Garde-Cerdán T. Factors influencing the formation of histaminol, hydroxytyrosol, tyrosol, and tryptophol in wine: Temperature, alcoholic degree, and amino acids concentration. *Food Chem*. 2016; 197:1038-1045.

- Carneiro CN, Gomez FJV, Spisso A, Silva MF, Azcarate SM, Dias F. Geographical characterization of South America wines based on their phenolic and melatonin composition: An exploratory analysis. *Microchem J.* 2020; 158:105240.
- EFSA Panel on Dietetic Products; Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive. *EFSA J.* 2011; 9:203.
- Fracasetti D, Vigentini I, Lo Faro AFF, De Nisi P, Foschino R, Tirelli A, Orioli M, Iriti M. Assessment of Tryptophan, Tryptophan Ethylester, and Melatonin Derivatives in Red Wine by SPE-HPLC-FL and SPE-HPLC-MS Methods. *Foods.* 2019; 8(3):99.
- Mercolini L, Mandrioli R, Raggi MA. Content of melatonin and other antioxidants in grape-related foodstuffs: measurement using a MEPS-HPLC-F method. *J Pineal Res.* 2012; 53(1):21-28.
- Piñeiro Z, Cantos-Villar E, Palma M, Puertas B. Direct liquid chromatography method for the simultaneous quantification of hydroxytyrosol and tyrosol in red wines. *J Agric Food Chem.* 2011; 59(21):11683-11689.
- Wang ST, Le J, Peng R, Li Y. Efficient extraction and sensitive LC-MS quantification of hydroxytyrosol in wine, oil and plasma. *Food Chem.* 2020; 323:126803.

