



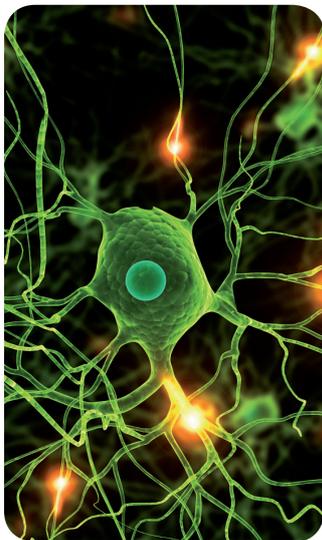
MÁSTERES de la UAM

Facultad de Ciencias
/ 15-16

Química Agrícola
y Nuevos Alimentos



excelencia Campus Internacional
UAM
CSIC+



**Determinación
del contenido basal
de estilbenos
en hojas de vid
mediante HPLC-MS**
*Encina Gutiérrez
Carazo*

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Máster en Química Agrícola



Trabajo Final de Máster

**DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO
BASAL DE ESTILBENOS EN HOJAS DE
VID MEDIANTE HPLC-MS**

Realizado por **Encina Gutiérrez Carazo**

Tutores: **Dr. Eugenio Revilla García**
Dra. Rosa A. Arroyo García

Septiembre 2016

Índice

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 La vid y sus principales compuestos fenólicos	2
1.2 Propiedades y biosíntesis de los estilbenoides	3
1.3 Niveles de estilbenos en vinos. Importancia de factores ambientales y tecnológicos.....	6
1.4 Características de la Colección Ampelográfica de Zalla.....	8
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 Material vegetal	11
3.2 Reactivos y patrones	11
3.3 Métodos.....	12
3.4 Análisis estadísticos.....	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
4.1 Descripción de los cromatogramas	14
4.2 Determinación cuantitativa de estilbenos.....	17
4.3 Estudio estadístico de los resultados	20
5. CONCLUSIONES	25
BIBLIOGRAFÍA	26

RESUMEN

Los estilbenos son una clase de polifenoles presentes en las plantas considerados como beneficiosos para la salud. El más conocido es el resveratrol, un compuesto sintetizado por algunos organismos vegetales, entre ellos, la vid, como consecuencia de su exposición a estreses tanto bióticos como abióticos. Esta molécula se encuentra sobre todo en las bayas; sin embargo, en el resto de la planta destaca el piceido, su principal derivado glucosilado.

En este trabajo se ha determinado la concentración basal de resveratrol y piceido en hojas de 37 genotipos de vid silvestre procedentes del País Vasco junto con cuatro accesiones de variedades cultivadas de vid común, dos sensibles al ataque por hongos y dos resistentes. Para ello se han extraído los compuestos con metanol/agua y se ha cuantificado la concentración de estos estilbenos mediante HPLC-MS. Además, para comparar mejor los resultados se han realizado algunos estudios estadísticos que han complementado el trabajo, mostrando cómo se han distribuido las muestras analizadas.

Las concentraciones de resveratrol apenas fueron notorias en las hojas sometidas al análisis, pero las de piceido permitieron realizar una clasificación en base a sus niveles basales. Además, el análisis estadístico complementó el estudio, clasificando las muestras en varios subgrupos, que han permitido definir los genotipos presumiblemente más resistentes a ataques fúngicos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La vid y sus principales compuestos fenólicos

Actualmente, uno de los cultivos más importantes y más explotados en España y en Europa es la vid. Esto es debido a su principal producto, el vino, considerado una de las bebidas alcohólicas más consumidas a nivel mundial. En España, esta planta cuenta con 1,2 millones de hectáreas para su cultivo, lo que lo convierte en el país con mayor extensión cultivada de viñas, ocupando un 15% de la extensión mundial de los viñedos.

La vid pertenece al género *Vitis*, familia Vitaceae, la cual se divide en dos subgéneros: Muscadinia y Euvitis. Al subgénero Euvitis pertenece la vid común (*Vitis vinifera* L.) y una serie de especies americanas que se utilizan como portainjertos. *V. vinifera* es la especie, con mucho, más importante por la calidad de sus frutos, distinguiéndose dos subespecies: *V. vinifera sylvestris*, salvaje en Europa durante miles de años; y *V. vinifera sativa*, que es actualmente la que más se emplea en la elaboración de vinos (De Andrés *et al.*, 2012).

Tanto en la planta como en su principal producto, el vino, existen distintos tipos de compuestos fenólicos. Estos se caracterizan por ser moléculas orgánicas en cuyas estructuras está presente al menos un grupo fenol (anillo bencénico unido a uno o más grupos funcionales hidroxilo, bien en forma libre o bloqueado). La mayoría son metabolitos secundarios y están presentes en todos los tejidos vegetales, aunque aparecen en mayor concentración en el fruto (Flanzy *et al.* 2003). Los compuestos fenólicos, además, se pueden encontrar en diferentes formas: simples y solubles como los antocianos; polimerizadas y solubles como los taninos; o polimerizadas e insolubles como las ligninas.

Los compuestos fenólicos se clasifican en dos grupos principales: los flavonoideos y los no flavonoideos. Dentro de los compuestos flavonoideos se sitúan las antocianinas y los flavonoles, caracterizados por presentar dos anillos bencénicos unidos por un heterociclo oxigenado saturado. Estos, pueden encontrarse en forma libre (catequinas) o bien polimerizados (taninos condensados) y aparecen en los raspones, los hollejos y las semillas (Vrhovsek *et al.*, 2012).

Por otro parte, los no flavonoideos se encuentran en todas las partes del racimo, aunque predominan en la pulpa. Dentro de este grupo se distinguen según su estructura química los ácidos fenólicos y los estilbenos. Los ácidos fenólicos comprenden los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos cinámicos, y suelen encontrarse mayoritariamente en la pulpa. Por otro lado, los estilbenos aparecen más en el hollejo y se sintetizan como respuesta a condiciones de estrés, como son la insolación excesiva, la salinidad del suelo y las enfermedades fúngicas, tales como el mildiu o la botritis. Por esto último, su concentración varía dependiendo del estado sanitario de la planta. Están formados por dos anillos bencénicos unidos entre sí por una cadena insaturada de dos átomos de carbono, de forma que los dos anillos bencénicos se encuentran conjugados (Figura 1).

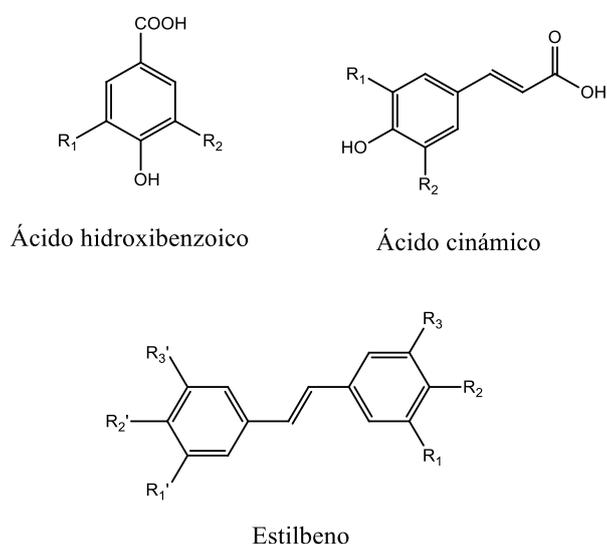


Figura 1. Estructuras básicas de algunos compuestos no flavonoideos.

1.2 Propiedades y biosíntesis de los estilbenoides

Los estilbenos son fitoalexinas presentes sobre todo en las bayas de la vid. Son sintetizados por la enzima estilbenosintetasa y su contenido se incrementa notablemente desde el envero hasta la maduración de la uva. El estilbeno más destacado en la vid es el 3,5,4'-trihidroxiestilbeno, más conocido como **resveratrol**, y es sintetizado por las plantas como respuesta a condiciones de estrés. Este compuesto aparece principalmente en el hollejo, y su mayor concentración alcanza los 20 µg/g de materia fresca en uvas maduras (Jeandet *et al.*, 1991; Burns *et al.*, 2002). Además, el resveratrol y sus derivados

también se encuentran en otros órganos de la parte aérea de la planta tales como las hojas, los sarmientos y los zarcillos (Lachman *et al.*, 2016).

Este compuesto presenta hasta 43 derivados, y entre sus beneficios destacan sus propiedades anticancerígenas, antifúngicas y antiinflamatorias, así como una gran capacidad cardioprotectora (Gresele *et al.*, 2011). Los dímeros y oligómeros del resveratrol son sintetizados en la planta como defensa contra ataques exógenos, o bien, para eliminar los compuestos tóxicos producidos por patógenos (Flamini *et al.*, 2013). El resveratrol, al igual que muchos polifenoles, puede glicosilarse para prevenir su degradación enzimática. Uno de sus principales derivados glucosilados es el monoglucósido conocido como **piceido**, destacado en medicina por evitar la síntesis de ADN en ciertos tumores (Chong *et al.*, 2009).

Tanto el resveratrol como el piceido presentan isómeros geométricos (Figura 2), por lo que su estructura espacial es fundamental para la formación del resto de estilbenos. (Moss *et al.*, 2013). El *trans*-resveratrol se transforma en presencia de luz UV en *cis*-resveratrol, cambiando su disposición espacial y, por ende, sus posteriores rutas de degradación. Sin embargo, el isómero con mayor actividad biológica y que más beneficios presenta es la forma *trans* (Wang *et al.*, 2013).

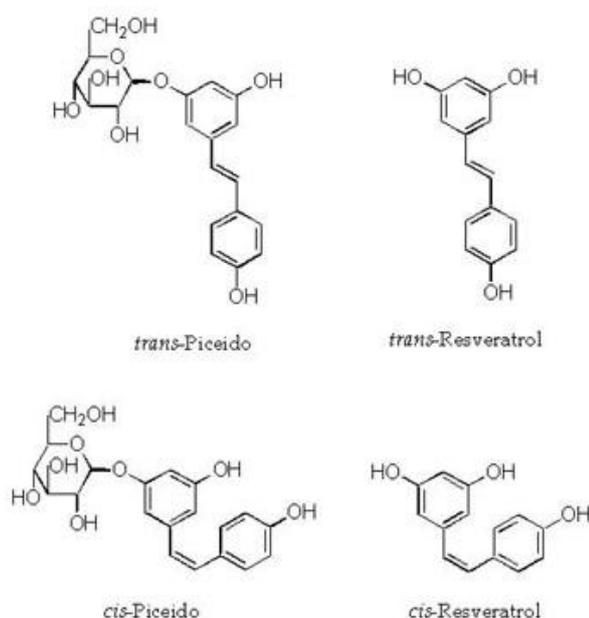


Figura 2. Estructuras químicas de los isómeros de resveratrol y piceido.

El resveratrol se sintetiza por la ruta metabólica fenilalanina/polimalonato, a partir de fenilalanina y/o tirosina, y con la ayuda de una serie de enzimas que dan lugar al ácido *p*-hidroxicinámico. Este ácido puede sintetizarse directamente de la tirosina o bien a partir de la fenilalanina pasando por un intermediario, el ácido cinámico. El ácido *p*-hidroxicinámico se transforma con la ayuda de la enzima cumaril CoA ligasa en cumaril coenzima A, que reacciona con tres moléculas de malonil CoA. Finalmente, por medio de la enzima resveratrol sintetasa se obtiene el trans-resveratrol, de acuerdo con la Figura 3 (Xi *et al.*, 2015).

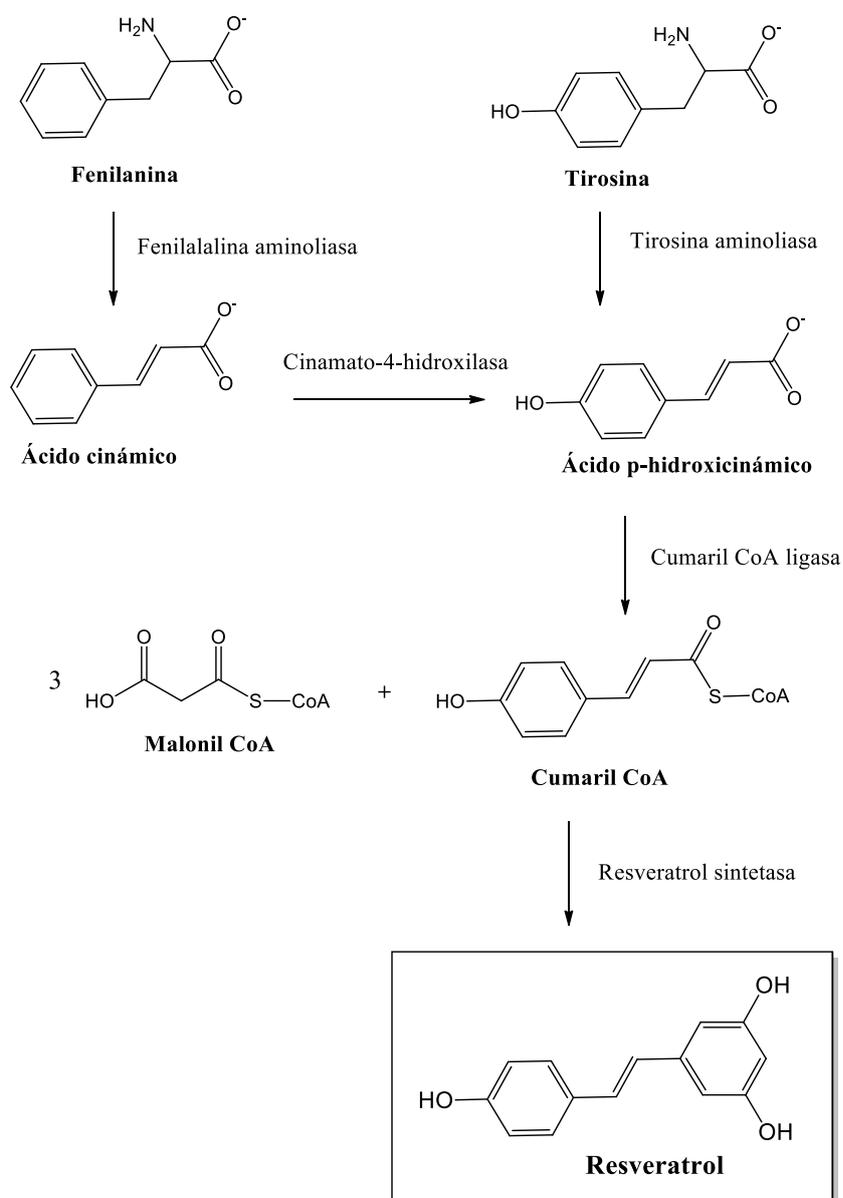


Figura 3. Esquema de la ruta biosintética del trans-resveratrol.

El resveratrol presenta una serie de derivados, que son sintetizados a partir de diferentes reacciones, tal y como se indica en la Figura 4. Los isómeros del piceido se generan a partir de la glucosilación de su esteroisómero de partida con una molécula de glucosa. La oxidación del resveratrol conduce a dímeros y trímeros formados a partir de este compuesto, conocidos como viniferinas. Un ejemplo de estos compuestos son la ϵ -viniferina (dímero) y la α -viniferina (trímero). Por último, la metilación de los esteroisómeros del resveratrol da lugar a los pterostilbenos, que son muy inestables a la luz y al aire (Duan *et al.*, 2015).

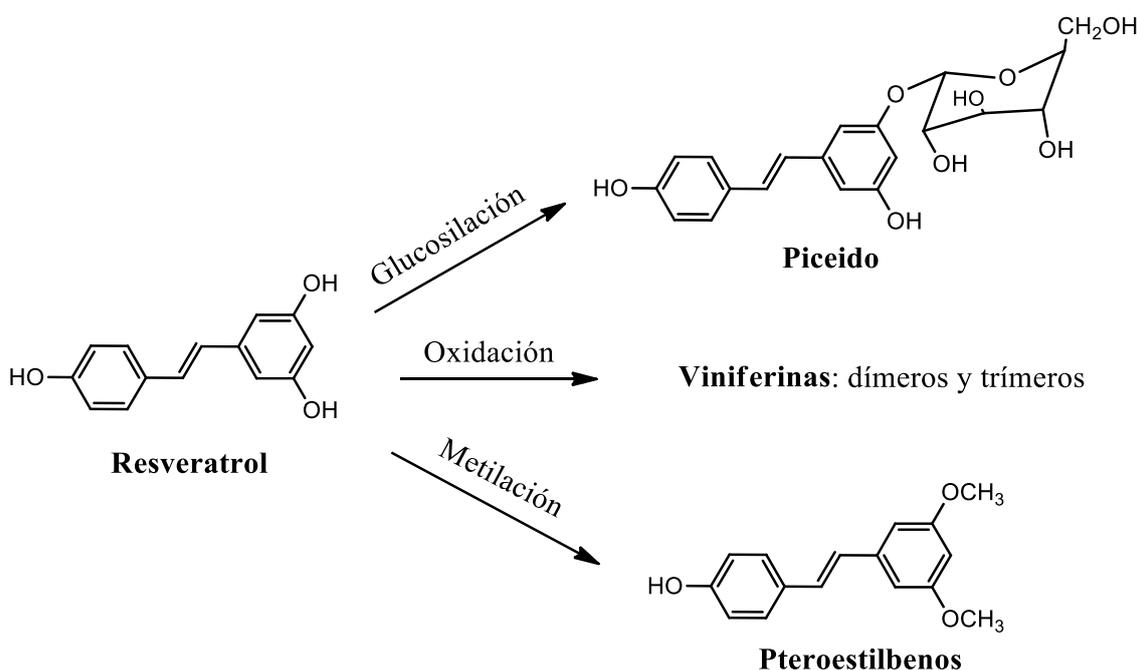


Figura 4. Biosíntesis de los derivados del resveratrol.

1.3 Niveles de estilbenos en vinos. Importancia de factores ambientales y tecnológicos

A lo largo de la historia, la utilización de la vid por parte del hombre ha evolucionado del consumo de la baya fresca comestible a la elaboración de vinos gracias al desarrollo tecnológico. La investigación enológica actual está orientada a definir la calidad del vino en relación a su composición química y a sus propiedades biológicas y de seguridad sanitaria. El contenido cualitativo y cuantitativo de compuestos fenólicos del vino constituye uno de los parámetros más importantes de su calidad, ya que contribuyen a sus características organolépticas (color, astringencia y amargor) y a sus

propiedades biológicas (Chung *et al.*, 2016). Los estilbenos pueden alcanzar concentraciones de hasta 10 mg/L en el vino, destacando entre ellos el isómero *trans* del resveratrol, pues puede llegar hasta los 5 mg/L. Por este motivo, sus derivados también aparecen en concentraciones superiores que los del isómero *cis* (La Torre *et al.*, 2014).

El vino tiene una composición fenólica muy diversa y compleja dependiendo de varios factores. El más elemental es el genoma de la vid, pues indica los niveles basales de polifenoles que presentan las diferentes variedades cultivadas. Además, los factores ambientales también ejercen un papel importante en la síntesis de polifenoles, destacando el caso de los estilbenos, ya que la planta los genera bajo condiciones de estrés. Debido a esto, es necesario controlar en un cultivo de vid parámetros como el clima, el suelo, el lugar de crecimiento, la orientación de la planta, la temperatura, así como la luz (González *et al.*, 2015).

Por otro lado, los tratamientos tecnológicos empleados en viticultura también modifican las concentraciones de estilbenos. Según La Torre *et al.* (2014), para una misma variedad de uva, las plantaciones en espaldera generan mayores concentraciones de resveratrol y piceído que otros tipos, como en cortina o en candelabro. Otro estudio realizado por Diago *et al.* (2014) revela que la defoliación temprana de la vid puede incrementar las concentraciones de resveratrol en vinos. En este caso, se producen dos efectos; el isómero *cis* es más abundante cuando la defoliación se realiza en el cuajado, mientras que el *trans* destaca más cuando este tratamiento se realiza en pre-floración. Además, la defoliación mecánica provoca un aumento en la concentración total de resveratrol, así como en la concentración de cada isómero, frente a la eliminación de la hoja manualmente.

Además, existen algunas prácticas enológicas que fomentan la acumulación de estilbenos en el vino, por ejemplo, la extracción de la piel de la baya y la hidrólisis enzimática de los glucósidos durante la vinificación. También afecta la levadura utilizada y la presencia de bacterias lácticas con actividad β -glucosidasa, ya que intervienen en la hidrólisis de los glucósidos, aumentando las concentraciones del resveratrol en el medio (Bavaresco *et al.*, 2012).

1.4 Características de la Colección Ampelográfica de Zalla

En este trabajo se han estudiado una serie de genotipos de vid silvestre preservados en la colección ampelográfica de Zalla, ubicada en la estación de Fruticultura de Zalla, situada en la antigua Granja y Caserío Modelo de Zalla (Figura 5). Posee 6 ha para su desarrollo, de las cuales 4,5 ha se encuentran en zona llana y 1,5 ha en zona de media ladera, ocupadas en un 50% entre frutales y vid. Este lugar tiene como función asesorar y apoyar tecnológicamente a las distintas asociaciones y entidades del subsector, como son la Asociación de Fruticultores (BIALKA); la Asociación de Chacolineros (BIALTXA); la Asociación de Productores de Sidra Natural (BIZKAIKO SAGARDOA) y la Denominación de Origen Bizkaiko Txakolina. Por otro lado, también tiene como objetivo proporcionar formación práctica a los agricultores, efectuar experimentaciones y ensayos agrícolas en cultivos y recuperar el cultivo de la vid, que anteriormente fue sometido a fuertes ataques de plagas y enfermedades.

La Estación de Fruticultura de Zalla se encuentra situada en el concejo de Zalla, en el País Vasco, a 24 km al oeste de Bilbao, en la cuenca del río Cadagua. En esta zona, el río forma un valle característico con dos llanuras a ambos lados (Norte y Sur) que se encuentran rodeadas por alienaciones montañosas. Esta región presenta un clima oceánico, caracterizado por alcanzar temperaturas moderadas, donde el frío y la humedad invernal suelen producir nieblas intensas en todo el valle.

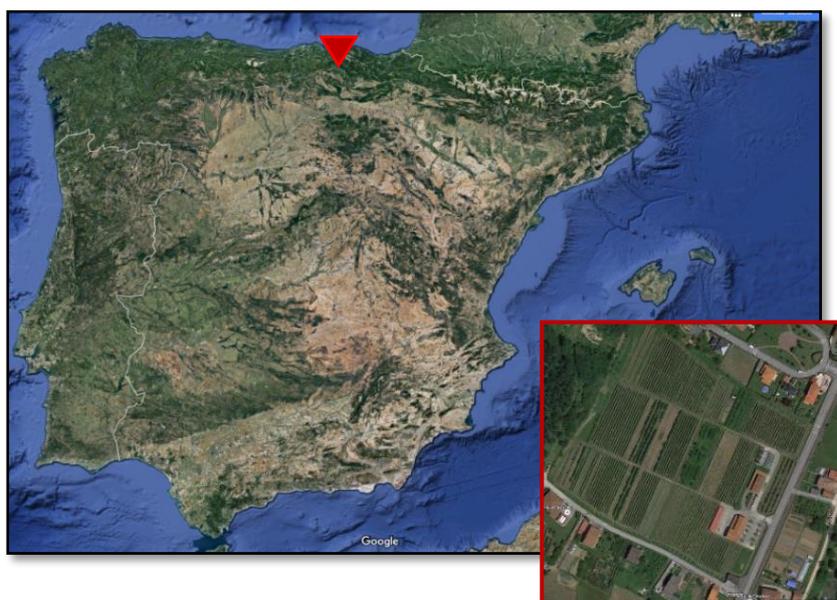


Figura 5. Localización de la Estación de Fruticultura de Zalla (Bilbao).

En el sector de vitivinicultura se realiza la selección clonal de las variedades autóctonas del País Vasco, como Hondarrabi Zuri, Zuri Zerratia, Mune Mahatsa, Berdexa Sarie y Hondarrabi Beltza. También se estudian las viníferas autóctonas y algunas viníferas foráneas injertadas en diferentes patrones y utilizando distintos sistemas de conducción. En los últimos años se ha comenzado a formar una pequeña colección de genotipos de vid silvestre procedentes de diversas poblaciones naturales del Norte de la Península Ibérica, con el fin de disponer de material genético susceptible de ser utilizado en proyectos de mejora genética de variedades cultivadas.

2. OBJETIVOS

Hoy en día se considera que la calidad de los vinos, y en especial la de los vinos tintos está estrechamente relacionada con los compuestos fenólicos que presentan, por lo que es interesante conocer y determinar su composición. Entre ellos, los estilbenos parecen ser especialmente interesantes no solo por sus funciones en la planta como fitoalexinas, sino porque se ha demostrado que tienen efectos beneficiosos para la salud de los consumidores de productos de la vid.

Dentro de la familia de los estilbenos, presentan especial interés el *trans*-resveratrol y su glucósido conocido como *trans*-piceido, pues su concentración en la planta está asociada a la aparición de situaciones de estrés, entre ellas ataques por hongos patógenos y la exposición excesiva a la radiación UV. De todos los órganos de la vid, las hojas poseen mayor interés para evaluar la mayor o menor susceptibilidad de las plantas a daños por esas situaciones, pues es posible muestrearlas en cualquier momento del ciclo de cultivo.

El principal objetivo de este Trabajo Final de Máster es determinar el contenido basal de *trans*-resveratrol y *trans*-piceido en hojas de distintos genotipos de vid silvestre, con fin de evaluar si podría utilizarse como una herramienta para conocer su grado de susceptibilidad a infecciones fúngicas. Para ello se ha utilizado material vegetal procedente de diferentes zonas del País Vasco, que se encuentra conservado en la colección ampelográfica de la Estación de Fruticultura de Zalla (Vizcaya), utilizando como referencia cuatro accesiones de vid común, dos sensibles y dos tolerantes a hongos, y que se conservan en la misma colección. Los resultados del estudio pretenden facilitar la selección de genotipos de vid silvestre que presenten, junto con otras características de interés enológico, una buena capacidad para biosintetizar estilbenos, y que puedan utilizarse en programas de mejora de variedades cultivadas de vid.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Para el desarrollo de este trabajo se han utilizado hojas de *V. vinifera* subsp. *sylvestris* (plantas silvestres) y de *V. vinifera* subsp. *sativa* (variedades cultivadas), mantenidas en la colección ampelográfica de la Estación de Fruticultura de Zalla (Vizcaya, España). La colección presenta un marco de plantación en calles orientadas SSO a NNE para que ambos lados de la planta reciban la misma insolación y un sistema de conducción en espaldera que aumenta la superficie foliar y potencia la biosíntesis de azúcares y polifenoles. El portainjerto utilizado en estas plantas es Richter-110, que es el más común en España.

Se muestrearon hojas de 37 genotipos de vid silvestre y de 4 accesiones de vid común (una de la variedad Cabernet Sauvignon, otra de la variedad Hondarrabi Zurri y dos de la variedad Hondarrabi Beltza). Cada accesión presenta entre 1 y 4 plantas y se tomó como muestra la 5ª hoja comenzando desde el ápice, ya que de acuerdo con la literatura (Stein *et al.*, 1985; Dercks *et al.*, 1989) las hojas jóvenes y las senescentes no sintetizan grandes concentraciones de estilbenos.

Las muestras se recogieron en junio de 2015 y se almacenaron a -80 °C para su posterior conservación. Esta fecha se eligió principalmente por dos razones: para evitar las alteraciones metabólicas propias del envero que pueden modificar los contenidos de estilbenos, y debido a su proximidad a la primavera, estación donde llueve en exceso y por lo tanto existe mayor probabilidad de desarrollo de hongos patógenos.

3.2 Reactivos y patrones

Los disolventes empleados para la extracción fueron de grado analítico, suministrados por Sigma Aldrich (Tres Cantos, España). El agua destilada se purificó antes de su uso con un sistema Milli-Q (Milipore, Bedford, MA). Los disolventes utilizados en la cromatografía fueron de calidad HPLC. Los patrones de *trans*-piceido, *trans*-resveratrol y ácido *o*-cumárico empleados en este estudio fueron proporcionados por Sigma Aldrich (Tres Cantos España).

3.3 Métodos

3.3.1 Extracción de estilbenos

La extracción de *trans*-resveratrol y *trans*-piceido se llevó a cabo mediante el método descrito por Vrhovsek *et al.* (2012). Para ello se trituraron las muestras con un molinillo de análisis IKA® A11, a -80 °C, utilizando nitrógeno líquido para alcanzar esta temperatura. Se tomaron tres alícuotas de cada muestra, de 1g aproximadamente en botes opacos y se adicionó a cada una, 50 µL de un patrón interno (ácido o-cumárico, 2 g/L) para corregir las posibles pérdidas de material vegetal que pudiesen surgir durante el proceso. Después se adicionaron 0,8 mL de triclorometano y 1,2 mL de una mezcla metanol /agua (2:1) y se agitaron los tubos para mezclar ambas fases durante 1 minuto. A continuación, las muestras se pusieron en un agitador orbital durante 15 minutos a temperatura ambiente. Acto seguido, se centrifugaron a 1000 g y 4 °C durante 10 minutos, y se recogió la fase acuosa compuesta por el extracto en metanol acuoso. La extracción se repitió mediante una nueva adición de 1,2 ml de metanol /agua (2:1) al sedimento y las fracciones de cloroformo y agitando durante 15 min. Después de la centrifugación, se combinaron las fases superiores de las dos extracciones, se enrasaron a 5 mL, y se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm de PTFE.

3.3.2 Determinación cuantitativa de estilbenos

La determinación de estilbenos se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un espectrómetro de masas (HPLC-MS). Este equipo estaba compuesto por un cromatógrafo Agilent 1100 Series y un detector de masas Agilent Technologies 6120 Quadrupole LC/MS.

La separación se realizó con una columna cromatográfica 200-C18-11 (Synergi 4µ Fusion-RP 80^a, 150x4.6 mm 4micron Phenomenex), regulada a una temperatura constante de 26 °C. Como eluyentes se utilizaron dos fases móviles: la fase A, compuesta de agua y ácido fórmico al 1%, y la fase B compuesta de acetonitrilo. El flujo de elución fue de 0,5 mL/min y se realizó en gradiente, tal y como se muestra en la Tabla 1. El volumen de inyección de muestra fue de 10 µL y cada muestra se inyectó por duplicado, de forma que, para cada accesión, se dispuso de tres valores analíticos, siendo cada uno de ellos la media de las dos inyecciones realizadas para cada réplica.

Tabla 1. Gradiente de elución utilizado en la determinación de estilbenos.

Tiempo (Min)	% Eluyente A	% Eluyente B
0	90	10
20	40	60
21	10	90
26	10	90
27	90	10
37	90	10

La detección de los compuestos se realizó mediante un espectrómetro de masas de ionización química a presión atmosférica (APCI +/-), cuyos parámetros se detallan a continuación.

Las masas de ionización detectadas fueron de 229 (+) y de 389 y 163 (-). Se utilizaron dos fragmentadores, uno de 80 V para las masas moleculares de 229 y 389 (resveratrol y piceido) y otro de 160 V para la masa molecular de 163 (patrón interno). Se empleó un gas de secado con un flujo de 10 L/min a una temperatura de 350 °C. La presión del nebulizador fue de 30 psig y la temperatura de vaporización fue de 200 °C. El voltaje del capilar y el de carga eran ambos de 2000 V y se empleó una corriente de corona de 4 μ A para el ión molecular de m/z 229.

La determinación cuantitativa de estilbenos se llevó a cabo por el método del patrón interno, utilizando para este fin ácido *o*-cumárico. Esta técnica se empleó con el fin de minimizar las alteraciones entre las muestras extraídas y de corregir las posibles interferencias en la señal del HPLC-MS que son difíciles de controlar. En este caso, el ácido *o*-cumárico que se adicionó a la muestra permitió obtener las concentraciones de estilbenos más precisas en las muestras analizadas (Hernández *et al.*, 2002). Finalmente, para obtener una mayor representatividad, todas las muestras se inyectaron en el equipo por duplicado.

3.4 Análisis estadísticos

Todos los datos obtenidos han sido analizados utilizando un programa informático de análisis estadístico de datos denominado Stratgraphic 5.0 Plus (Statistical Graphics Corp, Warrentong Va, USA). Este programa permite realizar diferentes gráficos estadísticos con el fin de clasificar y ordenar las muestras, de una manera más sencilla y visual, en función de sus resultados.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Descripción de los cromatogramas

Para la determinación cuantitativa de *trans*-resveratrol y *trans*-piceido en las muestras analizadas se han extraído los cromatogramas aportados por Servicio Interdepartamental de Investigación (SIIdI) de la Universidad Autónoma de Madrid. La técnica empleada de ionización química a presión atmosférica es un tipo de ionización blanda que no producen apenas fragmentaciones en la molécula de interés. Se suelen apreciar los iones $[M+H]^+$ y $[M-1]^+$ según se trabaje en modo positivo o negativo y se forman iones que permiten identificar el peso molecular del compuesto (Wu *et al.*, 2005). En los cromatogramas que se van a mostrar a continuación, se compara el compuesto de interés en la muestra con su correspondiente patrón, de tal modo que a partir de su ión molecular y su tiempo de retención se determinó su presencia en las hojas.

El cromatograma de *trans*-piceido se muestra en la Figura 6. Este cromatograma fue registrado a una relación m/z de 389 unidades de masa atómica (u), con un rango de 388,7 a 389,7 u. El piceido presenta una masa molecular de 390 g/mol, por lo que la señal m/z detectada en el cromatograma corresponde al ion resultante de la pérdida de un protón $[M-1]^+$.

Por otro lado, el cromatograma presenta picos cercanos con la misma relación m/z , con señales destacadas. Estos picos se pueden deber a la fragmentación de otros estilbenos presentes en la muestra. Tal y como sugiere Wei *et al.* (2016), estos compuestos pueden ser diferentes viniferinas, que son dímeros y trímeros formados a partir del resveratrol. Las dos más notorias, a 15 y 16,5 minutos podrían ser la ϵ -viniferina y δ -viniferina, respectivamente (Vrhovsek *et al.*, 2011).

En la Figura 7 se muestran los cromatogramas de *trans*-resveratrol, obtenidos a una m/z de 229, en un rango de 228,7 a 229,7 u. El resveratrol presenta una masa molecular de 228 g/mol, por lo que la m/z registrada se debe al fragmento protonado de este compuesto $[M+1]^+$. En este caso, su presencia en la muestra es muy inferior al resto de estilbenos detectados, lo que es de esperar teniendo en cuenta que en la vid es un intermediario en la biosíntesis de otros estilbenos.

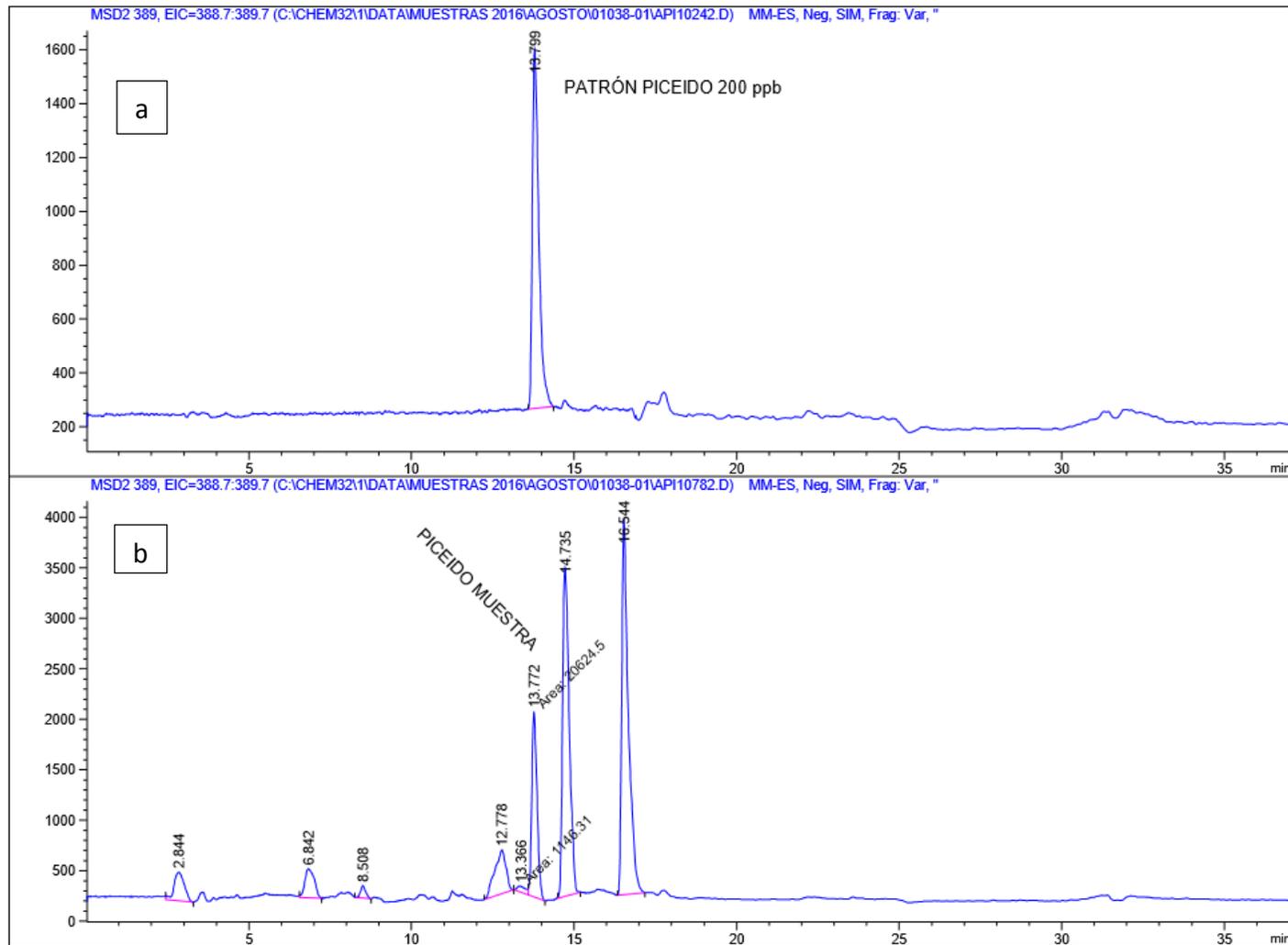


Figura 6. Comparación de los cromatogramas de *trans*-piceido entre el patrón (a) y la muestra HB2 (b).

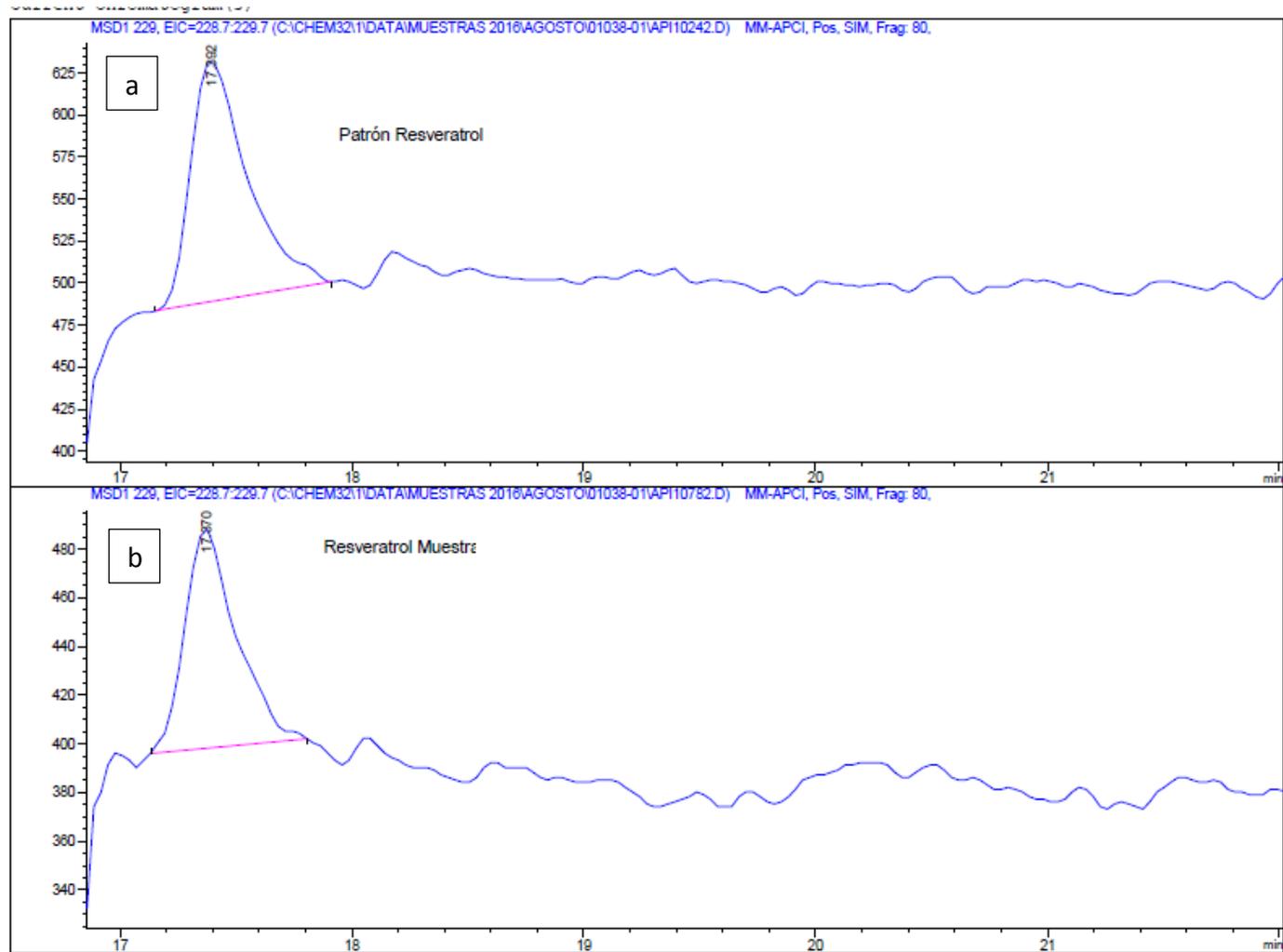


Figura 7. Comparación de cromatogramas de *trans*-resveratrol entre el patrón (a) y la muestra HB2 (b).

Bajo estas condiciones de separación, el cromatograma de *trans*-piceido revela que este compuesto presenta un tiempo de retención de 14 minutos, mientras que el de *trans*-resveratrol presenta un tiempo de retención medio de 17,5 minutos. Esto concuerda con lo esperado, ya que se trata de una separación cromatográfica en fase inversa y, por lo tanto, el estilbeno glucosilado, al ser más polar, queda menos retenido en la columna.

4.2 Determinación cuantitativa de estilbenos

La determinación cuantitativa de estilbenos en los extractos de las muestras en estudio se llevó a cabo a partir de sus respectivos patrones y mediante el método de calibración de patrón interno, utilizando para este fin ácido *o*-cumárico, mediante HPLC-MS, que es una técnica que permite diferenciar los compuestos con relativa sencillez ya que sus masas moleculares junto con sus fragmentaciones son únicas para cada uno (Vergara *et al.*, 2012). A la vez, es una técnica bastante sensible, capaz de detectar pequeñas variaciones en las concentraciones de los patrones, por lo que las rectas de calibrado se ajustan adecuadamente a una recta con buenos coeficientes de correlación lineal. De este modo se han realizado las rectas de calibrado de *trans*-resveratrol y *trans*-piceido que se muestran en la Figura 8.

Como límites de cuantificación se han considerado aquellos situados por encima del patrón más bajo cuantificado para cada compuesto. Se realizaron dos rectas de calibrado para cada patrón, aunque en este trabajo sólo se han incluido las más representativas. La recta de calibrado de *trans*-piceido presenta un rango de linealidad de 100 a 1000 µg/L, mientras que la de *trans*-resveratrol alcanza una linealidad que va desde los 100 a los 500 µg/L de compuesto.

En la Tabla 2 se muestran las concentraciones de piceido correspondientes a las accesiones de variedades cultivadas: CS (Cabernet Sauvignon), HZ (Hondarrabi Zuri), HB1 y HB2 (Hondarrabi Beltza), siendo las dos primeras sensibles a hongos y las otras dos, más resistentes, de acuerdo con la información facilitada por la Estación de Fruticultura de Zalla.

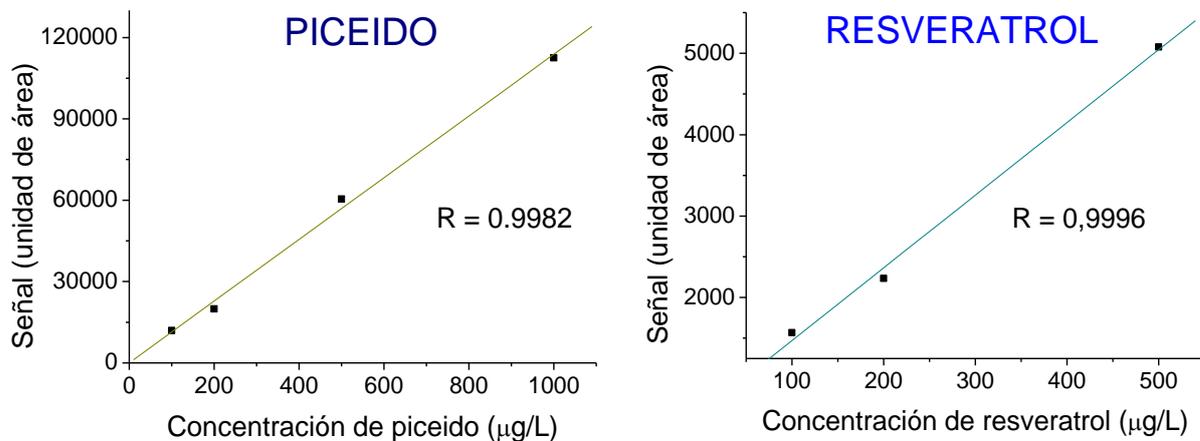


Figura 8. Rectas de calibrado de *trans*-piceido y *trans*- resveratrol

Tabla 2. Concentraciones medias de *trans*- piceido ($\mu\text{g/g}$) en las accesiones de variedades cultivadas

Muestra cultivada	Concentración de <i>trans</i> - piceido ($\mu\text{g/g}$)	
CS	1,44 \pm 0,16	Sensibles
HZ	1,16 \pm 0,16	
HB1	2,52 \pm 0,12	Resistentes
HB2	2,65 \pm 0,08	

En la Tabla 3 aparecen los contenidos de *trans*-piceido de las muestras de vid silvestre procedentes de poblaciones naturales. Los resultados se han clasificado en tres grupos. El grupo 1, que presenta una concentración de *trans*-piceido inferior a 0,5 $\mu\text{g/g}$ (destacada en color naranja) correspondiente a la muestra 22. El grupo 2 está formado por 28 muestras que presentan contenidos entre 0,5 y 1,5 $\mu\text{g/g}$, y el grupo 3 por 8 muestras con concentraciones de *trans*-piceido superiores a 1,5 $\mu\text{g/g}$ (sombreado azul). De este tercer grupo cabe destacar la muestra 32 que presentó niveles cercanos a los de las dos accesiones de la variedad Hondarrabi Beltza analizadas, que como se indicó se consideran resistentes al ataque de hongos.

Tabla 3. Concentraciones medias de *trans*-piceido ($\mu\text{g/g}$ hoja) en las muestras silvestres analizadas mediante HPLC-MS.

Muestra	Concentración de <i>trans</i> -piceido ($\mu\text{g/g}$)	Muestra	Concentración de <i>trans</i> -piceido ($\mu\text{g/g}$)
1	$1,16 \pm 0,19$	20	$0,98 \pm 0,08$
2	$0,76 \pm 0,05$	21	$0,82 \pm 0,02$
3	$0,73 \pm 0,15$	22	$0,32 \pm 0,05$
4	$1,16 \pm 0,06$	23	$1,20 \pm 0,06$
5	$0,89 \pm 0,08$	24	$1,22 \pm 0,16$
6	$0,98 \pm 0,13$	25	$0,78 \pm 0,07$
7	$1,60 \pm 0,26$	26	$1,70 \pm 0,13$
8	$1,15 \pm 0,06$	27	$0,76 \pm 0,10$
9	$0,84 \pm 0,09$	28	$1,39 \pm 0,03$
10	$1,77 \pm 0,20$	29	$1,06 \pm 0,10$
11	$1,32 \pm 0,07$	30	$1,78 \pm 0,06$
12	$1,60 \pm 0,12$	31	$1,14 \pm 0,13$
13	$0,99 \pm 0,06$	32	$1,91 \pm 0,31$
14	$1,66 \pm 0,14$	33	$1,04 \pm 0,14$
15	$0,90 \pm 0,04$	34	$1,24 \pm 0,08$
16	$1,06 \pm 0,04$	35	$1,58 \pm 0,26$
17	$0,97 \pm 0,08$	36	$0,72 \pm 0,06$
18	$1,06 \pm 0,06$	37	$1,07 \pm 0,10$
19	$0,95 \pm 0,10$		

En cuanto a contenidos en *trans*-resveratrol, solo en la muestra HB2 se obtuvieron resultados cuantificables, de $1,05 \pm 0,46 \mu\text{g/g}$ de hoja, pero presentando un coeficiente de variación bastante elevado (43%). En el resto de las muestras no ha sido posible determinar su concentración, ya que su señal se encontraba por debajo de los límites de cuantificación (marcados por el patrón de menor concentración determinado, de $200 \mu\text{g/L}$) y por lo tanto sus señales se confundían con el ruido de fondo producido por el detector del espectrómetro de masas. Estos resultados están de acuerdo con lo indicado por la bibliografía para otras variedades cultivadas de vid (Lachman *et al.*, 2016).

Tanto el resultado de *trans*-resveratrol como los datos de concentraciones de piceido revelan que las muestras de la variedad Hondarrabi Beltza presentan concentraciones más elevadas de estilbenos en hoja. Esto implica que, debido a su genoma, poseen genes que favorecen la biosíntesis de estilbenos en su organismo, esto las hace son más resistentes a ataques por hongos al producir con facilidad mayor cantidad

de esos compuestos. Sin embargo, sucede el caso contrario en las muestras con menos concentración de *trans*-piceido, pues en ellas sus genes promueven en menor medida la síntesis de enzimas implicadas en la síntesis de estilbenos (Katalinic *et al.*, 2013).

Los resultados muestran que hay mucho más *trans*-piceido en las hojas que *trans*-resveratrol, lo que era de esperar, dado que, en hoja, los estilbenos se encuentran preferentemente en su forma glucosilada para protegerse de la oxidación (Xi *et al.*, 2015). Una explicación plausible es que, puesto que el resveratrol está muy ligado a situaciones de estrés, tanto biótico como abiótico, los genes encargados de su síntesis presentan niveles de sobreexpresión muy elevados ante la presencia de elicitores (compuestos estructurales que actúan como señalizadores cuando se produce una reacción de estrés biótica o abiótica).

Por otro lado, las concentraciones de *trans*-piceido son inferiores a las descritas en la bibliografía consultada (Katalinic *et al.*, 2013; Lachman *et al.*, 2016; Vrhovsek *et al.*, 2011; Vrhovsek *et al.*, 2012). Esto es debido sin duda a que en muchos estudios se procede a la inducción de la biosíntesis de estilbenos sometiendo a las plantas a condiciones de estrés, mientras que en este estudio se han determinado concentraciones basales. Por eso, este trabajo se puede considerar como un punto de partida para estudiar, en los genotipos que se consideren adecuados, el efecto de la exposición de las plantas a condiciones de estrés inducidas sobre la biosíntesis de estilbenos. Una opción sería exponer las plantas a un exceso de luz UV, ya que se ha demostrado que altas insolaciones aumentan la síntesis de estos compuestos. Otra opción sería inducir un ataque fúngico con hongos como *Plasmopara viticola*, y de este modo estudiar las variaciones de *trans*-resveratrol en las hojas, tal y como sugieren Mattivi *et al.* (2011). De este modo se podrían comparar sus nuevas concentraciones con las basales determinadas en este trabajo y establecer cuáles podrían ser más resistentes a esas condiciones de estrés, tanto bióticas como abióticas.

4.3 Estudio estadístico de los resultados

Con el fin de analizar las diferencias entre los datos de los genotipos silvestres, se procedió a realizar varios análisis estadísticos para describir las características de la población estudiada. Lo primero que se comprobó fue si los datos obtenidos seguían una distribución normal, para lo cual se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. De acuerdo con esta prueba, la población sigue una distribución normal con un 95% de confianza, puesto que el valor-P más pequeño (0,571027) es mayor o igual a 0,05.

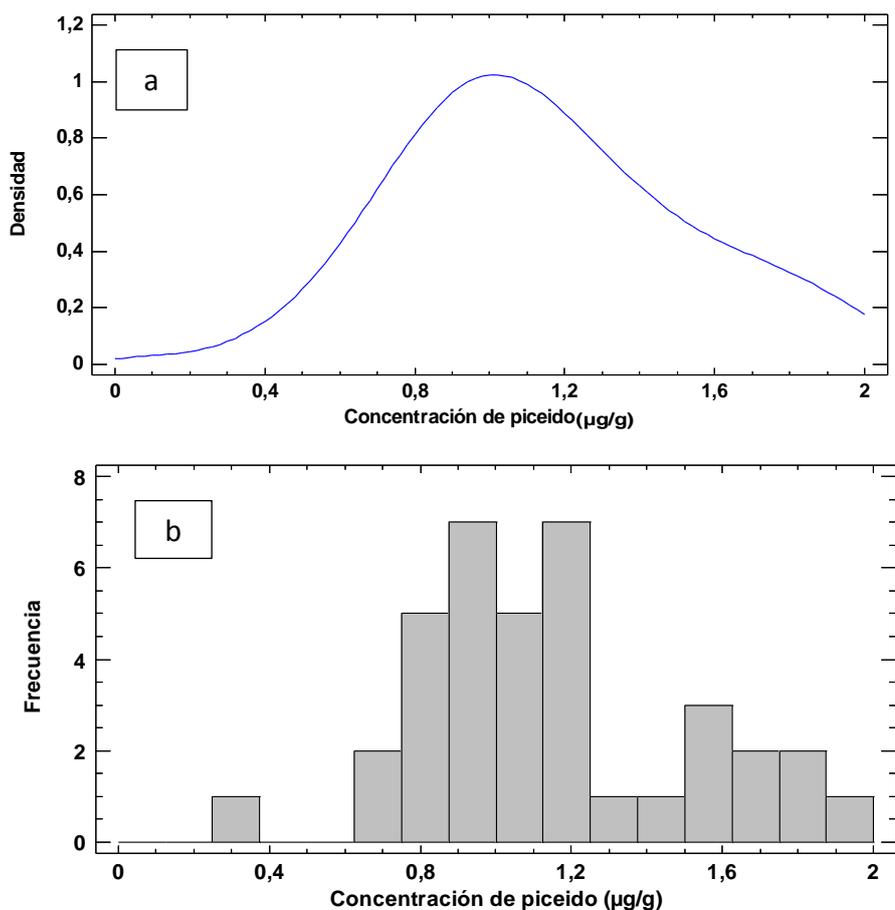


Figura 9. Trazo de densidad (a) y gráfica de frecuencias (b) para la concentración de *trans*-piceido en las hojas de las muestras de vid silvestre

La Figura 9 muestra la traza de densidad y la gráfica de frecuencias obtenidas con los datos de concentración de *trans*-piceido en las hojas de vid silvestre. Se puede apreciar que la traza de densidad es ligeramente asimétrica, con un máximo que corresponde a la media ($1,14 \pm 0,36 \mu\text{g/g}$). Esto es debido a que, como se observa en la gráfica de frecuencias, hay una cierta acumulación de datos en la zona superior a la media (de 1,4 a 2 $\mu\text{g/g}$). Aun así, existe un máximo que concuerda con el valor medio de los datos.

A continuación, se intentó clasificar las muestras de vid silvestre en función de la concentración de piceido. En la Figura 10 se muestra el promedio de las muestras silvestres junto con las accesiones cultivadas resistentes y sensibles. En esta gráfica se pueden distinguir tres grupos dependiendo de su contenido en este estilbeno, ya descritos en el apartado anterior. En el grupo 1 se sitúa la muestra 22, se puede considerar un

genotipo muy sensible al ataque de hongos. El grupo 2 (entre 0,5 y 1,5 $\mu\text{g/g}$), comprende las accesiones cultivadas sensibles y la mayoría de las muestras de vid silvestre, por lo que estas últimas pueden considerarse genotipos sensibles. Por último, el grupo 3 está compuesto por las accesiones de vid tolerantes y ocho muestras de vid silvestre con contenido de *trans*-piceido superior a 1,5 $\mu\text{g/g}$. Estas últimas pueden considerarse intermedias entre las accesiones cultivadas resistentes y las sensibles, y, por lo tanto, podrían tener interés para estudios posteriores

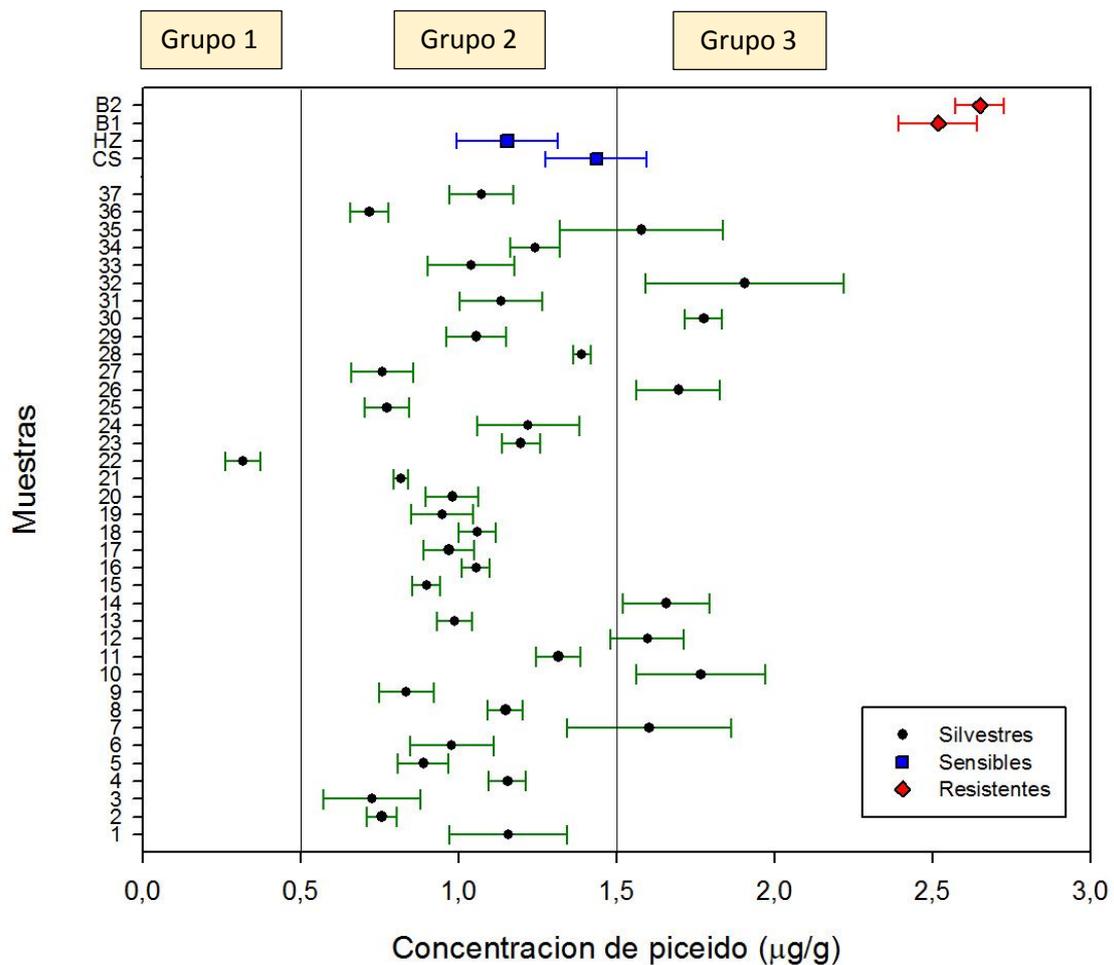


Figura 10. Comparación de las muestras analizadas en función de su concentración de *trans*-piceido ($\mu\text{g/g}$).

Finalmente se han estudiado los datos de los genotipos silvestres pertenecientes a los grupos 2 y 3 de manera independiente y descartando las accesiones de variedades cultivadas, con el fin de describir cómo se han distribuido estos nuevos subconjuntos de datos. Los resultados obtenidos a partir de la prueba de Kolmogorov-Smirnov indican que el valor-P más pequeño es superior a 0,05 en ambos casos (0,993069 para el grupo 3,

0,969744 para el grupo 2), por lo que debe aceptarse la hipótesis de que cada grupo de datos puede modelarse a una distribución normal, con un 95% de confianza.

En las Figuras 11 y 12 se muestran la traza de densidad y la gráfica de frecuencias de los grupos 2 y 3. Aunque en ambos casos la curva de distribución se ajusta a una distribución normal, se observan asimetrías que disminuyen la curtosis de la distribución.

El grupo 2 está compuesto por 28 muestras y presenta una concentración media de *trans*-piceido de $1,01 \pm 0,19 \mu\text{g/g}$. La traza de densidad de la Figura 11 muestra que la distribución de los datos está descompensada, existiendo una mayor densidad de valores en la zona con niveles inferiores a la media. Para complementar el estudio, la gráfica de frecuencias revela que existen más cantidad de datos situados en los valores inferiores que en los más elevados.

El grupo 3 presenta tan sólo 8 muestras, cuya concentración media de *trans*-piceido es de $1,70 \pm 0,11 \mu\text{g/g}$. La Figura 12 presenta una traza de densidad desigual, que describe una menor concentración de datos en las concentraciones de *trans*-piceido más elevadas de la gráfica. Además, la frecuencia de datos se encuentra mal distribuida a lo largo de la curva, ya que hay una gran parte de datos que se acumula en los niveles más bajos de la gráfica.

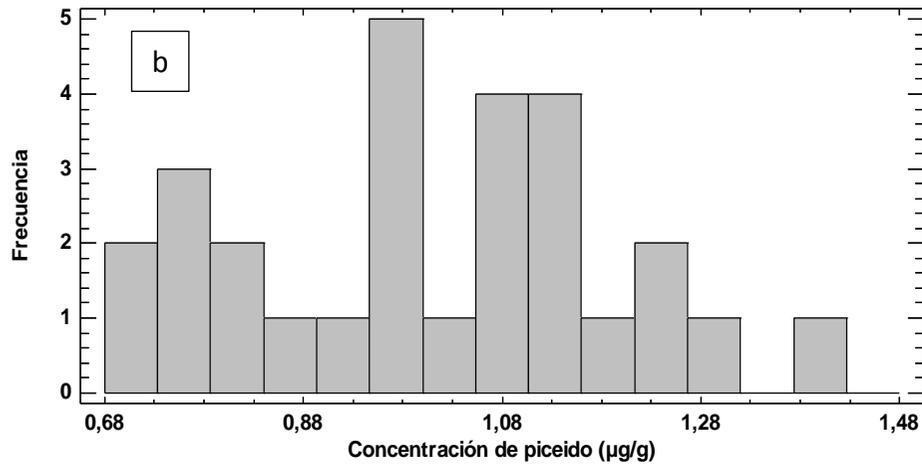
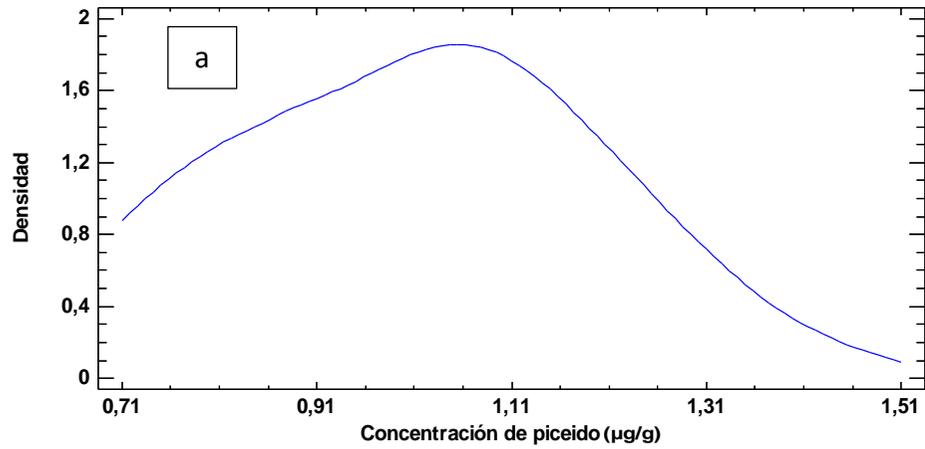


Figura 11. Traza de densidad (a) y gráfica de frecuencias (b) para la concentración de *trans*-piceido en las hojas de las muestras del Grupo 2.

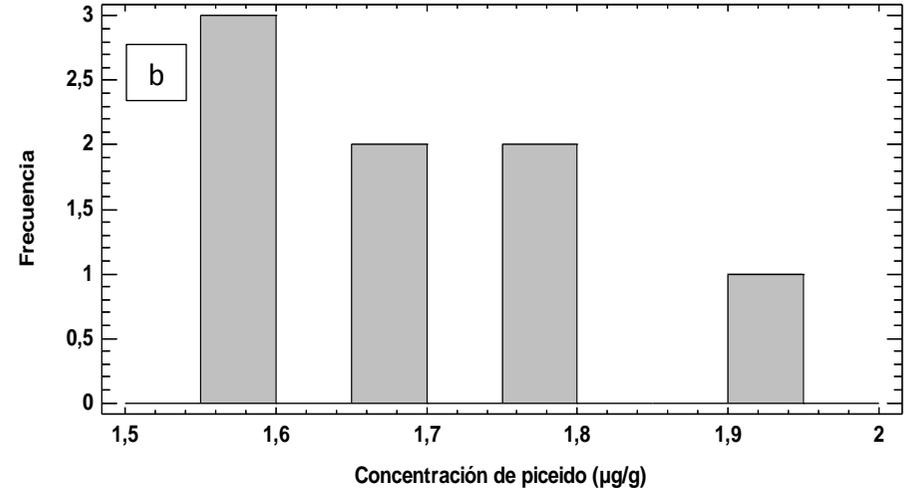
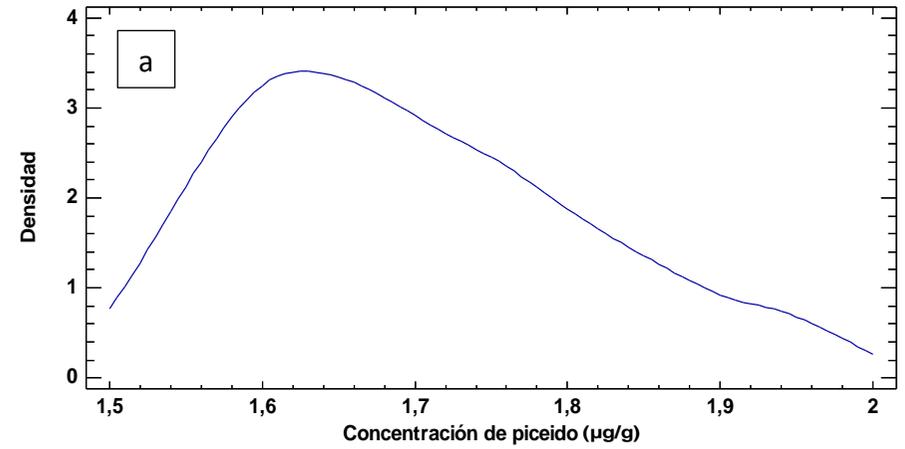


Figura 12. Traza de densidad (a) y gráfica de frecuencias (b) para la concentración de *trans*-piceido en las hojas de las muestras del Grupo 3.

5. CONCLUSIONES

- El contenido basal de *trans*-resveratrol en las hojas se encuentra por debajo de los límites de cuantificación del HPLC-MS en todas las muestras de vid silvestre estudiadas, lo que está de acuerdo con lo descrito en la bibliografía para distintas variedades de vid.
- El contenido basal de *trans*-piceido ha sido posible cuantificarlo en todos los casos. Las muestras se han podido clasificar en tres grupos en función de su concentración, encontrándose la mayoría en el grupo intermedio, en el que también se incluyen las accesiones de variedades cultivadas sensibles al ataque de hongos.
- Ninguno de los genotipos silvestres presenta un contenido de *trans*-piceido en hoja similar al de la variedad Hondarrabi Beltza, resistente a ataques fúngicos, aunque algunos presentan valores superiores a los de la variedades sensibles y más cercanos a los de las accesiones de vid común más resistentes.
- Estos resultados son un punto de partida para posteriores estudios en condiciones de estrés. De este modo se podrían comparar sus nuevas concentraciones con las basales determinadas en este trabajo y evaluar las accesiones que podrían ser más resistentes a las condiciones de estrés que se estudien, tanto bióticas como abióticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Bavaresco, L., Mattivi, F., De Rosoo, M., Flamini, R. Effects of elicitors, viticultural factors and enological practices on resveratrol and stilbenes in grapevine and wine. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2012**, 12, 1366-1381
- Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M.E., Crozier, A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 3337-3340.
- De Andrés, M.T., Benito, A., Pérez-Rivera, G., Ocete, R., López, M.A., Gaforio, L., Muñoz, G., Cabello, F., Marínez-Zapatero, J.M., Arroyo-García, R. Genetic diversity of wild grapevine populations in Spain and their genetic relationships with cultivated grapevines. *Molec. Ecol.*, **2012**, 21, 800–816.
- Chong, J., Poutaraud, A., Huguene, P. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Sci.*, **2009**, 177, 143-155.
- Chung, C., Rojanasasithara, T., Mutilangi, W., McClements, D.J. Stabilization of natural colors and nutraceuticals: Inhibition of anthocyanin degradation in model beverages using polyphenols. *J. Agric. Food Chem.*, **2016**, 212, 596-603.
- Dercks, W., Creasy, L.L. The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopora viticola* grapevine interaction. *Physiol. Mol. Plant P.*, **1989**, 34, 189-202.
- Diago, M.P., Ayestarán B., Guadalupe, Z., Garrido, A., Tardaguila, J. Phenolic composition of Tempranillo wines following early defoliation of the vines. *J. Sci. Food Agric.*, **2012**, 92, 925–934
- Duang, D., Halter, D., Baltenweck, R., Tisch, C., Troster, V., Kortekamp, A., Huguene, P., Nick, P. Genetic diversity of stilbene metabolism in *Vitis sylvestris*. *J. Exp. Bot.*, **2015**, 66, 3243-3257.
- Flanzy, C. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Ediciones Mundi. Prensa, Madrid, **2003**.
- Flamini, R., Mattivi, F., De Rosso, M., Arapitsas, P., Bavaresco, L. Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols. *Int. J. Mol. Sci.*, **2013**, 14, 19651-19669.
- González, C.V., Fanzone, M.L., Cortés, L.E., Bottini, R., Lijavetzky, D.C., Ballaré, C.L., Boccalandro, H.E. Fruit-localized photoreceptors increase phenolic compounds in berry skins of field-grown *Vitis vinifera* L. cv. Malbec. *Phytochemistry*, **2015**, 110, 46-57.
- Gressele, P., Cerletti, C., Guglielmini, G., Pignatelli, P., Gaetano, G., Violi, F. Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update. *J. Nutr. Biochem.*, **2011**, 22, 201-211

- Hernández-Hernández, L., González-Pérez, C. *Introducción al análisis instrumental*. Ariel: Barcelona **2002**.
- Jeandet, P., Bessis, R., Gautheron, B. The production of resveratrol (3, 5, 4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1991**, 42, 41-46.
- Katalinic, V., Mozina, S.S., Generalic, I., Skroza1, D., Ljubenkovic, I., Klancnik, A. Phenolic profile, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of leaf extracts from six *Vitis vinifera* L. varieties. *Int. J. Food Prop.*, **2013**, 16, 45–60.
- Mativvi, F., Vrhovsek, U., Malacarne, G., Masuero, D., Zulini, L., Stefanini, M., Moser, C., Velasco, R., Guella, G. Profiling of resveratrol oligomers, important stress metabolites, accumulating in the leaves of hybrid *Vitis vinifera* (Merzling x Terodelgo) genotypes infected with *Plasmopara viticola*. *J. Agric. Food Chem.*, **2011**, 59, 5364-5375.
- Moss, R., Mao, Q., Taylor, D., Saucier, C. Investigation of monomeric and oligomeric wine stilbenoids in red wines by ultra-high-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Sp.*, **2013**, 27, 1815–1827.
- La Torre, G.L., Alfa, M., Gentile, F., Poroti, A.G., Saitta, M., Tropea, A., Dugo, G. Phenolic profile in selected sicilian wines produced by different techniques of breeding and cropping methods. *Ital. J. Food Sci.*, **2014**, 26, 41-55.
- Lachman, J., Kotikova, Z., Hejtmankova, A., Pivec, V., Psenicnaja, P., Sulc, M., Stralkova, R., Dedina, M. Resveratrol and piceid isomers concentrations in grapevine shoots, leaves, and tendrils. *Hort. Sci.*, **2016**, 43, 25–32
- Stein, U., Heintz, C., Blaich, R. The in vitro examination of grapevines regarding resistance to powdery and downy mildew. *J. Plant Dis. Protect.*, **1985**, 92, 335-369,
- Vergara, C., von Baer, D., Mardones, C., Wilkens, A., Wernekinck, K., Damm, A., Macke, S., Gorena, T., Winterhalter, P. Stilbene levels in grape cane of different cultivars in Southern Chile: determination by HPLC-DAD-MS/MS method. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 929–933.
- Vrhovsek, U., Malacarne, D., Masuero, D., Zulini, L., Guella, G., Stefanini, M., Velasco, R., Mattivi, F. Profiling and accurate quantification of *trans*-resveratrol, *trans*-piceid, *trans*-pterostilbene and 11 viniferins induced by *Plasmopara viticola* in partially resistant grapevine leaves. *Aust. J. Grape Wine R.*, **2011**, 18, 11-19.
- Vrhovsek, U., Masuero, D., Gasperotti, M., Franceschi, P., Caputi, L., Viola, R., Mattivi, F. A versatile targeted metabolomics method for the rapid quantification of multiple classes of phenolics in fruits and beverages. *J. Agric. Food Chem.*, **2012**, 60, 8831–8840.

- Xi, H.F., Ma ,L., Wang, L.N., Li. S.H, Wang, L.J. Differential response of the biosynthesis of resveratrols and flavonoids to UV-C irradiation in grape leaves. *New Zeal. J. Crop Hort.*, **2015**, 43, 163–172.
- Wei, Y.J., Zhao, S.R., Li, J.M., Xue, B. Stilbene profiles in different tissues of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon and a comparison of their antioxidant activity. *Aust. J. Grape Wine R.*, **2016**, 22, 226–231.
- Wu, X., Prior, R.L. Systematic Identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 2589-2599.