

# El consumo moderado y continuado de vino tinto promueve el metabolismo fenólico intestinal

Irene Muñoz-González, Ana Jiménez-Girón, Pedro J. Martín-Álvarez, Begoña Bartolomé,  
M. Victoria Moreno-Arribas\*

*Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) (CSIC-UAM), Campus de la Universidad Autónoma de Madrid.  
C/Nicolás Cabrera 9, 28049, Madrid. Teléfono: 910017900. E-mail: victoria.moreno@csic.es*

## Resumen

Los polifenoles presentes en el vino son ampliamente metabolizados por la microbiota a lo largo del tracto gastrointestinal. Estos metabolitos fenólicos de origen microbiano parecen tener un papel relevante en los efectos beneficiosos para la salud derivados del consumo moderado de vino. Entre otros efectos, los polifenoles del vino y/o sus metabolitos pueden modificar o modular selectivamente la microbiota oral y del intestino. Con el objetivo de dilucidar como el consumo de vino afecta al **metabolismo fenólico intestinal y conocer la relevancia fisiológica de estos efectos, se ha realizado un estudio de intervención en humanos que incluye a 41 voluntarios sanos (33 casos y 8 controles), basado en el consumo moderado (250 mL/día) de vino tinto, durante 28 días. Antes y después de la intervención, se tomaron muestras de heces procedentes de los voluntarios. El análisis de metabolitos fenólicos mediante UPLC-ESI-MS/MS ha revelado un aumento significativo en el contenido total de metabolitos de origen microbiano, principalmente de ácidos benzoicos y 4-hidroxicinámicos, en las heces de los voluntarios tras la ingesta de vino, lo que demuestra que el perfil metabólico microbiano de las heces se modifica significativamente por la ingesta moderada de vino.**

**Palabras clave:** metabolitos fenólicos, heces, estudio de intervención, UPLC-ESI-MS/MS

## 1. Introducción

Investigaciones recientes indican que los efectos beneficiosos para la salud derivados del consumo moderado de vino y otros alimentos ricos en polifenoles, parecen deberse más a los metabolitos formados en el organismo y, principalmente por acción de la microbiota del colon, que a las formas moleculares presentes inicialmente en los alimentos [1,2]. Para algunos de estos metabolitos microbianos, concretamente los ácidos fenólicos, se han descrito distintas actividades biológicas, como actividad antioxidante, inhibición de la agregación plaquetaria y actividad antiproliferativa, entre otras [3]. Además, estudios recientes sugieren que algunos compuestos fenólicos y/o sus metabolitos, podrían originar cambios en la propia microbiota colónica y/o en su actividad metabólica [4]. Para estudiar el efecto de estos compuestos sobre la microbiota colónica, en una primera aproximación, se utilizan modelos *in vitro* que simulan las condiciones del tracto gastrointestinal. Sin embargo, a medida que las investigaciones avanzan, son necesarios estudios de intervención en humanos, que tengan en cuenta la variabilidad de la microbiota humana entre individuos, así como la ingestión continuada de polifenoles y las implicaciones en la salud intestinal de forma integrada [1]. El objetivo de este trabajo es conocer como el consumo moderado de vino afecta al metabolismo fenólico intestinal y evaluar su relación con la salud gastrointestinal.

## 2. Material y Métodos

### - Vino tinto

Se utilizó un vino tinto joven (variedad Pinot Noir, vendimia 2010), amablemente suministrado por Bodegas Miguel Torres S.A. (Cataluña, España). El vino se elaboró siguiendo los procedimientos de vinificación propios de la bodega y se seleccionó por su alto contenido fenólico: polifenoles totales = 1758 mg/L de equivalentes de ácido gálico, antocianinas totales = 447 mg/L de malvidín-3-glucósido y catequinas totales = 1612 mg/L de (+)-catequina. La capacidad antioxidante del vino, medida como ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno) fue 35,5 mmol de equivalentes Trolox/L.

### - Estudio de intervención en humanos

Se diseñó y organizó un estudio de casos y controles con 41 voluntarios sanos (33 casos y 8 controles). Para ello, se seleccionó una población homogénea de edad, sin enfermedades de base, no fumadores, con una edad comprendida entre 20-65 años y de ambos sexos. Como criterio de inclusión, los participantes no debían haber recibido antibióticos u otro tratamiento médico por lo menos durante 6 meses antes del estudio, ni padecer de enfermedades o trastornos intestinales. El estudio se llevó a cabo siguiendo las normas y autorización de un Comité de Bioética.

El estudio consistió en dos periodos, un período de lavado (2 semanas) en el que se restringió el consumo de alimentos ricos en polifenoles, y otro período de intervención (4 semanas) con vino (**Figura 1**). Los 8 sujetos controles siguieron las mismas pautas que los voluntarios, con la excepción de que no ingirieron el vino durante los 28 días de intervención.

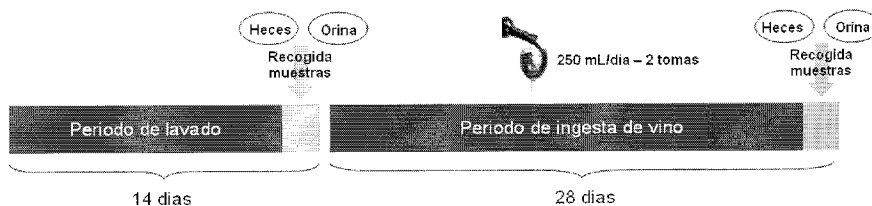


Figura 1. Esquema del protocolo del estudio de intervención

### - Preparación de las soluciones fecales

Para la preparación de las soluciones fecales se pesó un gramo de heces de cada muestra en un tubo falcon de 15 mL. Se añadieron 10 mL de solución salina estéril y se agitó con el vórtex hasta su homogeneización. Posteriormente se centrifugó el tubo falcon durante 10 min a 10.000 rpm y 4°C y se traspasó el sobrenadante a un falcon nuevo, el cual se volvió a centrifugar 1 ó 2 veces hasta que el sobrenadante quedara visualmente limpio. Finalmente, se filtró parte del sobrenadante con un filtro de jeringa de 0,22  $\mu\text{m}$  y se diluyó con acetonitrilo (1:4, v/v, acetonitrilo/solución fecal) antes de su análisis por UPLC-ESI-MS/MS.

### - Análisis de metabolitos fenólicos

Las muestras fecales obtenidas al inicio del estudio (muestras basales) y después de la ingesta de vino (muestras finales) se analizaron mediante UPLC-ESI-MS/MS según el método descrito por Sánchez-Patán y col. [5], que incluye un total de 60 metabolitos fenólicos.

## 3. Resultados y Conclusiones

### Identificación de metabolitos fenólicos

Se identificaron y cuantificaron un total de 35 metabolitos fenólicos (**Tabla 1**), siendo los más abundantes el ácido 3-hidroxi-mandélico, ácido benzoico, catecol/pirocatecol, ácido 4-hidroxihipúrico, ácido fenilacético, ácido 3-fenilpropiónico, ácido 4-hidroxi-5-(fenil)-valérico, 5-(4'-hidroxifenil)- $\gamma$ -valerolactona y ácido isoferúlico. Se comprobó que el número de metabolitos identificados fue mayor en las muestras finales, tras la ingesta de vino, que en las basales. Por ejemplo, el ácido siríngico se cuantificó tan sólo en 4 muestras al

inicio del estudio, mientras que tras la ingesta de vino fue posible su cuantificación en 26 de las 33 muestras. El elevado número de metabolitos fenólicos identificados después de la ingesta de vino pone de manifiesto un amplio metabolismo fenólico procedente de un vino con alto contenido en polifenoles.

Tabla 1. Metabolitos fenólicos identificados y cuantificados en las aguas fecales

<b>Ácidos benzoicos</b>	<b>Ácidos fenilacéticos y fenilpropiónicos</b>
Ácido gálico	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
Ácido 3,5-dihidroxibenzoico*	Ácido 4-hidroxifenilacético
Ácido protocatéquico*	Ácido 3-hidroxifenilacético*
Ácido 3-O-metilgálico*	Ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético
Ácido 4-hidroxibenzoico	Ácido fenilacético
Ácido 4-O-metilgálico	Ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)-propiónico
Ácido 3-hidroxibenzoico	Ácido 3-(4-hidroxifenil)-propiónico
Ácido vanílico*	Ácido 3-(3-hidroxifenil)-propiónico
Ácido siringico*	Ácido fenilpropiónico *
Ácido benzoico	
Ácido salicílico	
<b>Valerolactonas</b>	<b>Ácidos valéricos</b>
5-(3',4'-dihidroxifenil)-y-valerolactona*	Ácido 4-hidroxi-5-(3',4'-dihidroxifenil)-valérico
5-(3'-hidroxifenil)-y-valerolactona*	Ácido 4-hidroxi-5-(3'-hidroxifenil)-valérico*
5-(4'-hidroxifenil)-y-valerolactona	Ácido 4-hidroxi-5-(fenil)-valérico*
<b>Ácidos mandélicos e hipúricos</b>	<b>Alcoholes fenólicos</b>
Ácido 3-hidroxi-mandélico	Catecol/Pirocatecol
Ácido 4-hidroxihipúrico	4-metilcatecol
<b>Ácidos cinámicos</b>	
Ácido cafeico	
Ácido p-cumárico	
Ácido m-cumárico	
Ácido ferúlico	

\*Diferencias significativas tras la ingesta de vino frente al valor basal

### Cambios en el perfil metabólico en heces tras la ingesta de vino

La prueba de t-test para muestras independientes no mostró diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los valores medios de los contenidos de metabolitos fenólicos correspondientes a las muestras basales del grupo control respecto a las del grupo de intervención. Esto demuestra que el grupo control, elegido aleatoriamente, era representativo de la población. Además, como cabía esperar, el t-test para muestras dependientes y el test no paramétrico de Wilcoxon ( $P < 0,05$ ), no mostraron diferencias significativas entre las muestras del grupo control, al inicio del estudio y después del período de intervención de 4 semanas.

En cuanto al grupo de estudio, los test estadísticos (t-test y test no paramétrico de Wilcoxon) aplicados tras el análisis de las muestras fecales, antes y después de la ingesta de vino, mostraron diferencias significativas en el contenido de 11 metabolitos fenólicos, principalmente ácidos benzoicos y ácidos 4-hidroxi-valéricos (Tabla 1).

### Distribución de los voluntarios en función del contenido total de metabolitos fenólicos antes y después del estudio

Se llevó a cabo una distribución de los voluntarios atendiendo al contenido total de metabolitos fenólicos en las soluciones fecales, comparando las muestras basales y después del período de intervención, para ambos grupos, control y estudio, por separado (Figura 2, a y b, respectivamente). Como se puede observar, la distribución de los voluntarios en el grupo de control ( $n=8$ ) fue muy similar al inicio del estudio y después del período de intervención (Figura 2a). En ambos casos, se observa una distribución de tipo gaussiano. Sin embargo, la distribución de los voluntarios en el grupo de estudio ( $n=33$ ) muestra que dicha población tiende a estratificarse en 3 grupos diferentes tras la ingesta de vino, lo que pone de manifiesto las

diferencias interindividuales en el potencial metabólico para los polifenoles del vino, y por tanto, en su respuesta fisiológica frente a la ingesta moderada de vino tinto.

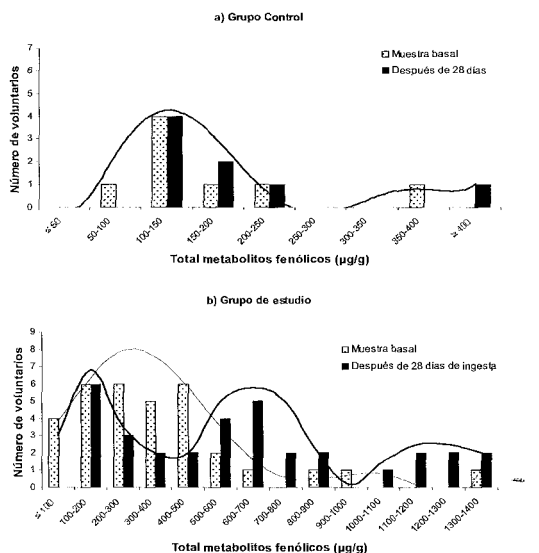


Figura 2. Distribución del grupo control (a) y del grupo de estudio (b) en función del contenido total de metabolitos fenólicos antes y después de los 28 días de estudio

En conclusión, el estudio de intervención llevado a cabo demuestra que el consumo moderado y continuado de vino promueve el metabolismo fenólico intestinal, aumentando significativamente el contenido de metabolitos fenólicos en la materia fecal. De igual forma, se observan cambios después de la intervención en el perfil fenólico en las heces, enriquecidas en ciertos ácidos benzoicos y 4-hidroxivaléricos. Todo ello podría estar relacionado con potenciales efectos beneficiosos a nivel intestinal derivados del consumo moderado de vino.

#### 4. Bibliografía

- [1] Requena, T.; Monagas, M.; Pozo-Bayón, M.A.; Martín-Álvarez, P.J.; Bartolomé, B.; del Campo, R.; Ávila, M.; Martínez-Costa, M.C.; Peláez, C. & Moreno-Arribas, M.V. 2010. Perspectives of the potential implications of wine polyphenols on human oral and gut microbiota. *Trends Food Sci. Tech.*, 21, 332-342
- [2] Scalbert, A. & Williamson, G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130 (8) 2073S-2085S
- [3] Urpi-Sarda, M.; Monagas, M.; Khan, N.; Lamuela-Raventos, R.M.; Santos-Buelga, C.; Sacanella, E.; Castell, M.; Permanyer, J. & Andres-Lacueva, C. 2009. Epicatechin, procyanidins, and phenolic microbial metabolites after cocoa intake in humans and rats. *Anal. Bioanal. Chem.* 394 1545-1556.
- [4] Monagas, M.; Urpi-Sarda, M.; Sánchez-Patán, F.; Llorach, R.; Garrido, I.; Gomez-Cordoves, C.; Andres-Lacueva, C. & Bartolome, B. 2010. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food Funct.* 1 233-253.
- [5] Sánchez-Patán, F.; Monagas, M.; Moreno-Arribas, M.V.; Bartolome, B. 2011. Determination of microbial phenolic acids in human faeces by UPLC-ESI-TQ MS. *J. Agric. Food Chem.* 59 2241-2247.

#### 5. Agradecimientos

Los autores agradecen a Bodegas Miguel Torres S.A., que amablemente ha proporcionado el vino tinto empleado. También agradecen a los voluntarios su participación en el estudio, y al MINECO y al CSIC la financiación obtenida para poder llevarlo a cabo.