

III Workshop en Investigación Agroalimentaria – WiA3.14. Cartagena, 12-13 de mayo de 2014

## Mapeo varietal de fitoprostanos en almendras: Identificación y cuantificación

A.M. Carrasco del Amor<sup>(1,2)</sup>, J. Collado-González<sup>(3)</sup>, A. Gil-Izquierdo<sup>(3)</sup>, E. Aguayo<sup>(1,2)</sup>

<sup>(1)</sup> Grupo de Postrecolección y Refrigeración, Dpto. Ingeniería de Alimentos, ETSIA-UPCT. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena, España. [anacarrascodelamor@hotmail.com](mailto:anacarrascodelamor@hotmail.com)

<sup>(2)</sup> Unidad Calidad Alimentaria y Salud, Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Campus Muralla del Mar. 30202 Cartagena, España.

<sup>(3)</sup> Dpto. de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Campus Universitario de Espinardo, 25. Apto. 164. 30100 Espinardo (Murcia).

### RESUMEN

Recientemente, algunos investigadores han estudiado la relación existente entre el estrés oxidativo y el contenido de determinados compuestos presentes en las plantas denominados fitoprostanos. Las almendras tienen un contenido elevado de ácidos grasos poliinsaturados siendo el mayoritario el ácido  $\alpha$ -linolénico. En 1998, se descubrió que los fitoprostanos se generan a partir del ácido  $\alpha$ -linolénico en una vía no enzimática, iniciada por una mayor formación de radicales libres. En este trabajo se propone la identificación y la cuantificación de fitoprostanos presentes en almendras averiguando si la variedad influye en el contenido de los mismos. Como resultado se obtuvo que en las cinco variedades de almendra estudiadas, el fitoprostano 9-F1t-fitoprostano fue el más abundante aunque también se obtuvieron otros fitoprostanos en menor concentración tipo 9-epi-9E1t-fitoprostano, 9-E1t-fitoprostano, 16-B1-fitoprostano y 9-L1-fitoprostano. Además, la concentración de fitoprostanos se vio afectada por la variedad siendo "Ramillete" la que presentó niveles más elevados.

**Palabras clave:** ácido  $\alpha$ -linolénico; ROS; espectrometría de masas; UHPLC

### 1. Introducción

A principios de 1990, una serie de compuestos similares a las prostaglandinas, fueron identificados por ser producidos en los mamíferos desde el ácido araquidónico, independientemente de la vía de la ciclooxigenasa [1], estos compuestos fueron denominados isoprostanos. Las plantas superiores no poseen ácido araquidónico (C20:4) por lo que no sintetizan isoprostanos ni prostaglandinas. De forma similar al origen de los isoprostanos en los mamíferos, se identificó un nuevo compuesto producido en plantas superiores, denominado fitoprostano (PPs). PPs son generados desde el ácido  $\alpha$ -linolénico en una vía no enzimática, iniciada por una mayor formación de radicales libres [2]. Estos compuestos son considerados marcadores fiables de estrés oxidativo en plantas superiores [3]. El campo de los PPs fue descubierto en el año 2000, cuando estos metabolitos fueron detectados por la oxidación no enzimática del ácido  $\alpha$ -linolénico [4]. En la actualidad hay como una veintena de publicaciones sobre este tema, lo

que demuestra que en este campo todavía queda mucho por investigar.

El almendro es una especie típica del paisaje Mediterráneo, España es el segundo mayor productor de almendra, después de Estados Unidos, además de ser el mayor consumidor, ya que las almendras forman parte de nuestra dieta mediterránea.

El consumo de almendras y nueces ha sido asociado con la disminución de enfermedades cardíacas coronarias y con el síndrome metabólico [5] esto puede estar relacionado por su perfil favorable de ácidos grasos insaturados (ácido linoléico y ácido linolénico) y, por tanto, relación con los PPs.

Las primeras investigaciones confirman que la genética, el tiempo de cosecha, el origen, condiciones ambientales, la composición del suelo, la madurez del fruto afectan a la composición de las almendras y de las nueces [6,7-8]. Por todo lo expuesto, el presente trabajo tiene como objetivo identificar y cuantificar la concentración de PPs presentes

en almendras y saber si éstos varían según la variedad.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Productos químicos y reactivos

El hexano fue obtenido de Proquilab (Cartagena, Murcia, España), Bis-Tris (bis 2-hydroxyethyl) amino-tris (hydroxymethylmethane) fue adquirido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO EEUU) como el resto de los disolventes necesarios para el cromatógrafo de líquidos-masas (LC-MS) como metanol, acetronitrilo y 2,6-di-butil hidroxi anisol (BHA).

Los cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) que se usaron fueron cartuchos Strata (Strata X-AW, 100 mg/3mL) adquiridos en Phenomenex (Torrance, CA, EEUU).

### 2.2 Preparación de las muestras

Las muestras fueron molidas en un molinillo de café hasta convertirlas en un fino polvo, 2-3 g de peso fresco, fue suspendido en una disolución que contenía 10 mL de BHA (10:01 v/v), se agitó durante 5 minutos y después se centrifugó (2000 *xg* durante 10 minutos), luego se extrajo el sobrenadante y se pasó por un filtro tipo Sep Pack.

### 2.3 Extracción de las muestras.

Los PPs presentes en las almendras fueron aislados mediante una extracción líquido-líquido (LLE) seguida de una extracción en fase sólida (SPE). La extracción LLE se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo: 1 mL de la muestra filtrada se disolvió en 1 mL de n-Hexano [9]. La solución fue diluida en 2 mL de metanol, se agitó y se volvió a diluir en 2 mL de BIS-TRIS buffer (0,02 M, HCl, pH=7). Seguidamente, se separó mediante los cartuchos de fase sólida, según el proceso previamente descrito por Medina y colaboradores [10]. Previamente, los cartuchos se acondicionaron con 2 mL de hexano, 2 mL de metanol y 2 mL de agua MilliQ. Cada muestra se filtró en un ratio de alrededor de una gota cada 2 segundos, después de esto, los cartuchos fueron lavados con 2 mL de hexano, 2 mL de agua MilliQ, 2 mL de una solución que contenía agua MilliQ y metanol (3/1) y 2 mL de acetronitrilo para

eliminar los compuestos indeseados. El compuesto deseado fue eluctado con 1 mL de metanol y fue secado usando un evaporador SpeedVac (Savant SPD121P, Thermo Scientific, MA, EEUU). El extracto seco fue reconstituido con 200  $\mu$ L de A/B disolventes (90:10, v/v), conteniendo el disolvente A una mezcla de agua MilliQ/0.01% de ácido acético y una solución de metanol/0.01% de ácido acético fue usado como disolvente B. A continuación, las muestras fueron sonicadas durante 10 minutos y centrifugadas (1000 *xg* durante 10 minutos) antes de ser filtradas por un filtro 0.45  $\mu$ m (Millipore, MA, EEUU).

Finalmente, 20  $\mu$ L de esta muestra fue inyectada y analizada por UHPLC-QqQ-MS/MS (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

## 3. Resultados y Discusión

Se identificaron 5 PPs cuya concentración dependía del tipo de variedad analizada. El fitoprostano 9-F1t-fitoprostano fue el más abundante (Tabla 1) aunque también se obtuvieron otros fitoprostanos en menor concentración como 9-*epi*-9E1t-fitoprostano, 9-E1t-fitoprostano, 16-B1-fitoprostano y 9-L1-fitoprostano. Los PPs F1 se encuentran normalmente en los lípidos de la membrana como se ha demostrado por los isoprostanos F2 en los mamíferos [11]. Como se ha citado anteriormente, estos compuestos son marcadores fiables de estrés oxidativo en plantas superiores y el tipo de variedad es un factor que influye en la cuantificación de PPs (Tabla 1). La variedad “Ramillete” presentó una mayor concentración de PPs F1 siendo estadísticamente similar a las variedades “Marcona” y “Ferrañes”.

## 4. Conclusiones

En las variedades estudiadas de almendra se identificaron 5 tipos de PPs siendo el F1, el de mayor concentración. Existió una influencia varietal siendo “Ramillete” la que presentó el mayor contenido en F1.

## 5. Agradecimientos

Se agradece al Instituto de Biotecnología Vegetal de la UPCT y al CEBAS-CSIC la utilización de los equipos de análisis.

## 6. Referencias bibliográficas

- [1] Morrow J.D., Minton T.A., Roberts, L.J. 1992. Prostaglandins 44: 155-163.
- [2] Imbusch R., Mueller M. J. 2000. Analysis of Oxidative Stress and Wound-Inducible Dinor Isoprostanes F 1 (Phytoprostanes F 1) in Plants. *Plant Physiol.* 124: 1293–1303.
- [3] Thoma I., Loeffler C., Sinha A. K., Gupta M., Krischke M., Steffan B., Mueller M.J. 2003. Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant J.* 34: 363–37.
- [4] Imbusch R., Mueller M. J. 2000. Formation of isoprostane F2-like compounds (phytoprostanes F1) from  $\alpha$ -linolenic acid in plants. *Free Radical Biology and Medicine*, 720-726. [5] Kris-Etherton, P.M., Zhao, G., Binkoski, A.E., Coval, S. M., Etherton, T.D. 2001. The effects of nuts on coronary heart disease risk. *Nutrition Reviews* 59: 103–111.
- [6] Lavedrine F., Ravel A., Villet A., Ducros V., Alary J. 2000. Mineral composition of two walnut cultivars originating in France and California. *Food Chem.* 68: 347–351.
- [7] Parcerisa J., Rafecas M., Castellote A.I., Codony R., Farrán A., Garcia J., (1995). Influence of variety and geographical origin on the lipid fraction of hazelnuts (*Corylus avellana* L.) from Spain: (III) oil stability, tocopherol content and some mineral contents (Mn, Fe, Cu). *Food Chem.* 53: 71–74.
- [8] Wakeling L. T., Mason R. L., D. Arcy R. B., Caffin N. A. (2001). Composition of pecan cultivars Wichita and Werstern Schley [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] grown in Australia *J. Agr. Food Chem.* 49: 1277–1281
- [9] Del Carlo M., Ritelli E., Procida, G., Murmura, F., Cichelli, A. 2006. Characterization of extra virgin olive oils obtained from different cultivars, *Pomologia Croatica* 12: 29–41.
- [10] Medina S., Dominguez-Perles R., Gil J.I., Ferreres F., García Viguera C., Martínez-Sanz J. M., Gil-Izquierdo A. 2012. A ultra-pressure liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry method for the analysis of 13 eicosanoids in human urine and quantitative 24 hour values in healthy volunteers in a controlled constant diet. *Rapid Commun. Mass Sp.* 26: 1249-1257.
- [11] Morrow J.D., Awad J.A., Boss H.J., Blair I.A., Roberts L.J. 1992. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed *in situ* in phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 10721–10725.

**Tabla 1.** Fitoprostano principal (9-F1t-Fitoprostano) en diversas variedades de almendras

Variedad	9-F1t PhytoP (ng/100g de peso fresco)
Ramillete	7796,39 <sup>a</sup>
Blanqueta	7016,28 <sup>ab</sup>
Guara	6682,42 <sup>abc</sup>
Marcona	5338,31 <sup>bcd</sup>
Ferrañes	4464,62 <sup>cd</sup>

Distintas letras indican diferencias significativas dentro de cada variedad según la prueba de Fisher ( $p < 0.05$ ).