



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
TÍTULO: MÉTODOS ANALÍTICOS PARA EL
DIAGNÓSTICO DE LOS ANTIOXIDANTES DEL
VINO

Autor: Blanca Fernández de Mesa González

Fecha: Febrero 2020

Tutor: María Laura Martín Carbajo

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN	4
1.1.COMPUESTOS POLIFENÓLICOS.....	4
1.1.1.Compuestos flavonoides	6
1.1.2Compuestos no flavonoides	7
1.2.LA OXIDACIÓN	8
2.OBJETIVOS.....	10
3.METODOLOGÍA	10
4.MÉTODOS ANALÍTICOS.....	10
4.1.DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS	10
4.1.1Determinación de los polifenoles totales	10
4.1.2.Determinación de la composición de los distintos polifenoles	12
4.2.DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	14
4.2.1.Método DPPH	15
4.2.2.Método FRAP	15
4.2.3.Método HRSA.....	15
4.2.4.Método TEAC (capacidad antioxidante en equivalentes de trolox)	16
4.2.5.Método CUPRAC	16
4.2.6.Método ORAC (oxygen radical absorbance capacity).....	16
4.2.7.Oxidación de las LDL's	16
5.RESULTADOS	17
6.CONCLUSIÓN	17
7.BIBLIOGRAFÍA.....	19

RESUMEN

El estudio del vino ha ido aumentando considerablemente en los últimos años. Esto se debe a la capacidad antioxidante, beneficiosa para el tratamiento de numerosas enfermedades actuales, que le confieren los compuestos polifenólicos.

Dentro de estos compuestos polifenólicos encontramos los compuestos flavonoides (antocianos, taninos, flavonoles y flavonas) y los no flavonoides (ácidos benzoicos, ácidos cinámicos y estilbenos). Estos compuestos se encuentran distribuidos de manera variable en las distintas partes de la uva.

Para diagnosticar el contenido de estos polifenoles se utilizan distintos métodos analíticos, que se han estudiado en este trabajo, entre los que destacan el método oficial de Folin-Ciocalteu y el que parece ser su sustituto, las nanopartículas de Ceri, para el diagnóstico de los polifenoles totales; y los métodos cromatográficos para separar estos polifenoles y poder determinar la concentración de cada grupo.

Asimismo, se utilizan distintos ensayos para determinar la capacidad antioxidante de una muestra de vino, la mayoría de los cuales tienen como mecanismo la transferencia de un electrón del polifenol a un radical, produciendo su reducción.

Palabras Clave: vino, polifenoles, métodos analíticos, antioxidante.

ABSTRACT

The study of wine has been increasing considerably in recent years. This is due to the antioxidant capacity, beneficial for the treatment of numerous current diseases, which are conferred by the polyphenolic compounds.

Within these polyphenolic compounds we find flavonoid compounds (anthocyanins, tannins, flavonols and flavones) and non-flavonoids (benzoic acids, cinnamic acids and stilbenes). These compounds are distributed in different ways in the different parts of the grape.

In order to diagnose the content of these polyphenols, different analytical methods are used, which have been studied in this work, among which the official Folin-Ciocalteu method and the one that seems to be its substitute, the Ceri nanoparticles, are used to diagnose the polyphenols totals; and the chromatographic methods to separate these polyphenols and to determine the concentration of each group.

Likewise, different tests are used to determine the antioxidant capacity of a wine sample, most of which have as a mechanism the transfer of an electron from the polyphenol to a radical, producing its reduction.

Key words: wine, polyphenols, analytical methods, antioxidant.

1.INTRODUCCIÓN

1.1.COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

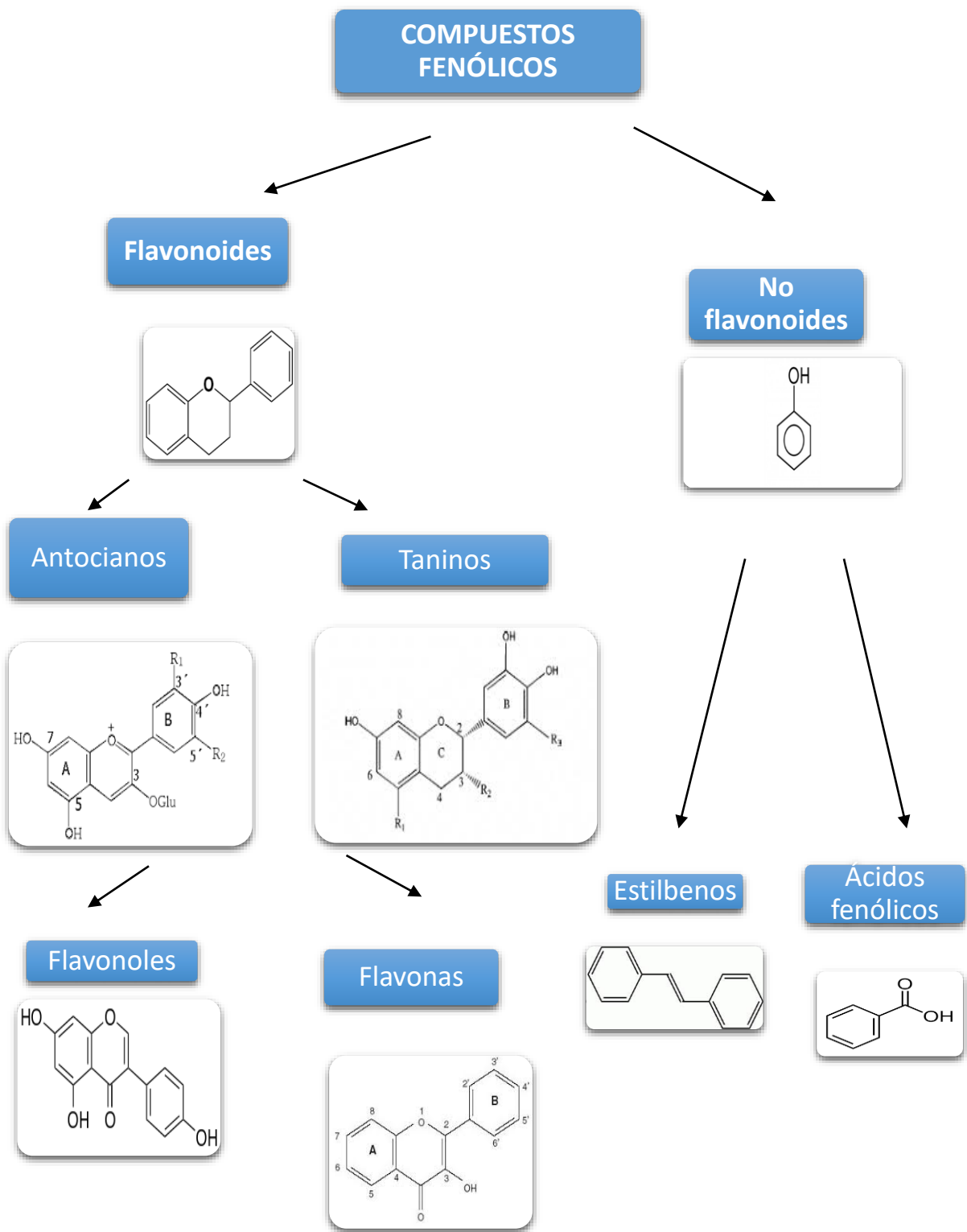
Según la definición que da el código internacional de prácticas enológicas de la OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino) “el vino es el resultado de la fermentación biológica o natural de la uva entera o de su mosto, llevada a cabo por microorganismos presentes en el medioambiente de la bodega o en la superficie de la propia uva”.

Por lo cual, las uvas son el elemento esencial por el que se elabora el vino. Pertenecen a la familia biológica de las *vitaceae*, familia que posee once géneros diferentes, de los cuales solo el *vitis*, y concretamente la especie *vinífera*, es interesante como fruta vinícola.

Las uvas, al tratarse de alimentos vegetales, están formadas por compuestos polifenólicos o polifenoles, los cuales pueden ser clasificados siguiendo varios criterios. De entre todos ellos, la clasificación más comúnmente empleada para describir la matriz fenólica de las uvas y los vinos se basa en su esqueleto carbonado, dividiéndose en compuestos no flavonoides y compuestos flavonoides. Estos polifenoles juegan un papel muy importante en los caracteres organolépticos o sensoriales de los alimentos, y en este caso, del vino. Sufren modificaciones con mucha facilidad, como las oxidaciones que contribuyen al envejecimiento y madurez del vino, desarrollándose así su buen sabor; a la vez que evitan la oxidación de otros componentes del mismo, que darían compuestos contrarios a la buena calidad. Entre estas sustancias se encuentran las responsables en mayor medida del color de las uvas (particularmente de las tintas o negras), jugando un importante papel en la evolución de los vinos con el envejecimiento. También son los responsables de la sensación de astringencia en la lengua y de la sensación que se nota en la boca (impresión táctil de los vinos). Además contribuyen al sabor, especialmente a los sabores amargos y a la apreciación organoléptica, distinguiéndose así un vino blanco de uno tinto no sólo por su sabor sino también por su olor. (1)

El contenido en compuestos polifenólicos del vino depende de la variedad vinífera y del rendimiento de la cosecha, así como de las condiciones edafoclimáticas y técnicas aplicadas al viñedo. Cuando la temperatura ambiental es elevada, durante el día, hay más cantidad de energía disponible; esto hace que se acelere el metabolismo vegetal, por lo tanto, la vid incrementa su biomasa (proceso de asimilación de nutrientes). Durante la noche la planta simplemente respira, utilizando la energía que fue acumulando en el transcurso del día. Cuanto mayor sea la temperatura nocturna, será mayor la cantidad de energía que esta consume para la respiración. Por consiguiente, el desarrollo óptimo de la vid se logra en zonas donde existe una gran amplitud térmica, con días soleados y cálidos, y noches frescas. (2)

Desde el punto de vista químico, estos compuestos constan de un anillo bencénico que contiene uno o varios grupos hidroxilos. Se pueden subdividir, según su estructura química en flavonoides o no flavonoides, como se muestra en la siguiente tabla.



1.1.1. Compuestos flavonoides

Todos ellos son derivados de la estructura básica de flavoglucinol, caracterizada por un esqueleto base de 15 átomos de carbono (C6-C3-C6) de tipo 2-fenil-benzopirona.

Dependiendo del grado de saturación y patrón de sustitución de los grupos funcionales, se clasifican en:

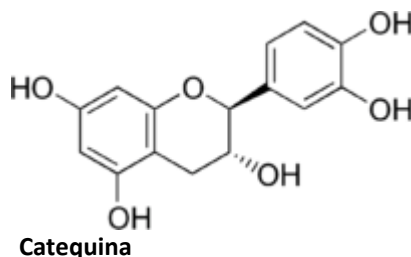
1.1.1.1. Antocianos

Derivan de las antocianidinas. Se trata de pigmentos naturales esterificados con una o más moléculas de azúcar que caracterizan a las uvas y los vinos tintos debido a que presentan coloraciones rojas-violáceas y a su vez están ausentes en uvas y vinos blancos. La intensidad del color varía con el pH del medio, siendo un rojo más intenso cuanto más elevada sea la acidez real, mientras es azulado o incoloro en medio neutro o ligeramente alcalino.

1.1.1.2. Taninos

Moléculas relativamente voluminosas capaces de dar combinaciones estables con las proteínas. Se forman por la polimerización de monómeros llamados flavanoles. Son los principales responsables de la astringencia y según su naturaleza se pueden clasificar en:

- Taninos hidrolizables: se utilizan como coadyudantes tecnológicos (auxiliares de fabricación), o bien están presentes en el corcho de los tapones.
- Taninos condensados: son polímeros más o menos complejos de flavan-3-oles. Los principales son la catequina y su isómero la epicatequina, pudiendo encontrarse este último en forma de éster gálico.



1.1.1.3. Flavonoles

Están presentes tanto en los vinos blancos como en los vinos tintos. Su coloración característica es amarilla, enmascarada en los vinos tintos por el rojo violáceo de los antocianos. (3) Sus formas glicosiladas son las más abundantes en el vino.

1.1.1.4. Flavonas

Estos compuestos constituyen una fracción minoritaria, por lo que presentan poco interés como antioxidantes.

1.1.2. Compuestos no flavonoides

No presentan la estructura básica de fluoroglucinol.

1.1.2.1. Ácidos fenólicos

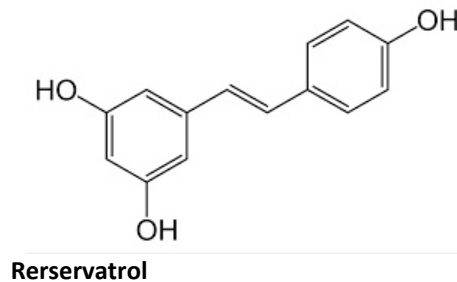
Son incoloros, inodoros e insípidos cuando se encuentran en una mezcla hidroalcohólica, aunque con el tiempo y la oxidación pueden adquirir o tornarse un color amarillento. Bajo la acción de algunos microorganismos, pueden transformarse en fenoles volátiles que presentan olores muy característicos. Los vinos tintos contienen mayor cantidad de ácidos fenólicos que los blancos.

Los ácidos fenólicos se caracterizan por la presencia de un solo anillo bencénico en su molécula y se clasifican en dos grupos: **ácidos benzoicos**, la gran mayoría de los cuales se encuentran de forma libre en el vino y **ácidos cinámicos** (C6-C3), los cuales se encuentran mayormente esterificados con ácido tartárico. (1)

1.1.2.2. Estilbenos

El más importante es el resveratrol. Está implicado en la resistencia de las bayas a los ataques fúngicos. Sus propiedades antioxidantes contribuyen a la calidad sanitaria de uvas y vino.

El resveratrol existe en dos formas isómeras, cis y trans. Se ha podido comprobar que el trans-resveratrol es estable durante meses cuando está protegido de la luz, excepto a pH mayor o igual a 10. La radiación ultravioleta desplaza el equilibrio isomérico hacia la formación de la forma cis. El isómero cis sólo es estable a pH cercanos a la neutralidad, un pH bajo favorece que la forma cis se isomerice a la trans. (3)



Estos compuestos fenólicos, están divididos en diferentes zonas de la uva, en cuya estructura se distinguen dos partes: las semillas y el conjunto de tejidos que las envuelven, denominado pericarpo. En el pericarpo se distinguen tres tipos de tejidos, ordenados concéntricamente alrededor de las semillas: el endocarpo, que recubre a las semillas y presenta estructura gelatinosa; el mesocarpo, tejido intermedio y que ocupa el mayor volumen de la baya y el exocarpo, tejido más externo que contiene la epidermis. Comúnmente, el exocarpo se conoce como hollejo y el mesocarpo junto con el endocarpo, forman la pulpa.

En la pulpa destaca la presencia de ácidos fenólicos y sus derivados. Los ácidos benzoicos, se encuentran, también, en las vacuolas del hollejo.

Los flavonoles y antocianos se encuentran localizados en las células del hollejo de la uva. Los flavan-3-oles se localizan en las semillas de las uvas y son los compuestos no coloreados más abundantes en la piel. En las uvas rojas, también se encuentran en la piel los antocianos.

En los vinos blancos los fenoles mayoritarios son aquellos procedentes de la pulpa, mientras que en los tintos, la maceración alcohólica de los hollejos y las semillas permite la liberación y solubilización en el vino. (4)

Desde el punto de vista enológico también tiene gran importancia la estructura leñosa que sujeta el conjunto de granos que forma el racimo de uva. Esta estructura se denomina raspón y permite conocer qué sustancias pueden incorporarse al vino cuando está presente durante la fermentación.

El raspón puede llegar a la bodega en dos estados: verde o maduro (lignificado). El raspón verde tiene un gran contenido en agua, clorofila, taninos, ácidos málico y tartárico, y sales minerales. Durante la fermentación le confieren al vino un sabor vegetal o herbáceo. Los raspones maduros contienen menos agua, taninos, y ácidos libres, y tienen, por el contrario, mayor proporción de sales ácidas. (5)

La cantidad y tipo de polifenoles en el vino depende en gran medida del proceso de vinificación, el cual variará dependiendo del producto final a obtener. Los vinos tintos, rosados y blancos se obtienen a partir de uvas tintas o verdes por diferentes métodos de vinificación.

Durante la vinificación del vino tinto, el jugo de uva se fermenta de 3 a 21 días en contacto con las partes sólidas de la uva, las cuales presentan mayor concentración de polifenoles y estos se dispersan en el jugo. Sin embargo, durante la vinificación del vino blanco, el zumo se separa de las partes sólidas inmediatamente después de la molienda de la uva. El proceso para el vino rosado es intermedio. Por lo tanto, el contenido de polifenoles será más alto en el vino tinto, más bajo en el vino blanco e intermedio en vinos rosados. El contenido promedio de polifenoles está alrededor de 1150 mg/L en los vinos tintos, 425 mg/L en el caso de los vinos blancos y 820 mg/L en rosados. (6)

1.2.LA OXIDACIÓN

La oxidación es uno de los procesos más importantes en el deterioro de los productos alimenticios. Tiene grandes repercusiones en el color, sabor y textura de los alimentos. Los antioxidantes protegen la calidad de un alimento y previenen su deterioro ocasionado por reacciones oxidativas. (7)

Se ha estimado que aproximadamente un 2% del oxígeno consumido por un organismo va a la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs), de las cuales, varias son radicales libres. Cuando la generación de estos radicales libres sobrepasa las numerosas barreras de defensa antioxidantes del organismo, se produce daño por lesión química de las estructuras biológicas y a este proceso lo denominamos estrés oxidativo (8). Estos radicales libres reaccionan con las distintas macromoléculas biológicas, así como con ADN, pudiendo ocasionar daños irreversibles que pueden llevar a muerte celular. La gran mayoría de

enfermedades, entre las que podemos destacar el cáncer, el Alzheimer o la arterioesclerosis, están asociadas a estrés oxidativo.

En el caso del vino, los polifenoles descritos anteriormente imparten la actividad antioxidante. Protegen a las LDL del daño oxidativo y su acción como antioxidante está relacionada, no sólo con su estructura química, sino también con su localización en la partícula. Esta función la pueden realizar mediante varios mecanismos:

- Actuando como atrapadores de radicales libres, teniendo cada tipo, especificidad por especies oxidantes distintas generadas en el organismo.
- Actuando como agentes quelantes de iones de metales de transición, es decir, uniéndose a estos iones y reduciendo la capacidad de estos metales pesados de generar radicales libres.
- Por sus propiedades de solubilidad pueden localizarse sobre la superficie de la partícula de LDL, disminuyendo el consumo de los antioxidantes propios de las LDL como vitamina E y carotenoides, y en algunos casos regenerando vitamina E oxidada en la partícula de LDL.
- Inhibiendo, activando o protegiendo enzimas específicas en el organismo. Los distintos polifenoles tienen cada uno actividades particulares. Por ejemplo, se ha observado que las catequinas preservan la actividad de la paraoxonasa, enzima asociada a las HDL que puede hidrolizar y regenerar lípidos oxidados en las LDL. Otros polifenoles inhiben oxigenasas celulares y por tanto, la producción de especies oxidantes del oxígeno y del nitrógeno dentro del cuerpo humano. (5)

Cada polifenol actuará por uno o más de estos mecanismos según sus propiedades particulares, sin embargo, en una mezcla como el vino, la capacidad antioxidante no está dada por la suma de las capacidades de cada componente, sino que también está determinada por la interacción entre ellos, dado que pueden producir efectos sinérgicos o inhibitorios. (1)

En enología es importante conocer el contenido en polifenoles, pues en un vino joven, el color depende de su composición en antocianos libres y sus copigmentos, y cuando el vino envejece, los antocianos libres desaparecen debido a su oxidación, o a su combinación directa con los flavanoles o mediada por el etanal. Las reacciones de los polifenoles y su degradación hacen que los compuestos fenólicos de los vinos tintos se modifiquen continuamente y se transformen en otras especies más estables, ocasionando pérdidas de color y astringencia durante su envejecimiento. (9)

Por tanto, la gran variedad de polifenoles que posee el vino y sus diversas características estructurales, posibilitan distintas propiedades de acción como antioxidante, lo que sumado a la capacidad de algunos polifenoles de inhibir o activar enzimas específicas en el organismo contrarias a la oxidación, explica las evidencias epidemiológicas relativas al consumo de polifenoles antioxidantes como protectores de enfermedades crónicas que hoy son la preocupación principal de la salud pública mundial. (5)

2.OBJETIVOS

En el presente trabajo se tratarán de alcanzar los siguientes objetivos:

1. Realizar un estudio bibliográfico de la metodología analítica adecuada para la determinación de compuestos fenólicos presentes en el vino.
2. Realizar una revisión de las distintas técnicas analíticas que pueden ser utilizadas para determinar la capacidad antioxidante de un vino., así como compararlas entre ellas.
3. Estudio de los distintos polifenoles del vino.

3.METODOLOGÍA

Basada en la revisión bibliográfica mediante el uso de plataformas de bases de datos tales como Pubmed, Pubchem, PhenolExplorer, Sciencedirect y Web of Science permitiendo seleccionar artículos atendiendo a fecha de publicación, índice de impacto e idioma, inglés o español y biblioteca virtual de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, así como informes de organismos oficiales y sociedades Científicas.

4.MÉTODOS ANALÍTICOS

Los métodos de determinación de la capacidad antioxidante se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o la muestra. Por otra parte, hay ensayos que se basan en la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo. Los distintos métodos difieren en el agente oxidante, en el sustrato empleado, en la medida del punto final, en la técnica instrumental utilizada y en las posibles interacciones de la muestra con el medio de reacción. (10)

4.1.DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

4.1.1.Determinación de los polifenoles totales

4.1.1.1. Método Folin-Ciocalteu (IFC):

Es el método oficial utilizado. Se trata de una reacción de oxidorreducción, por lo que además se puede considerar como un método de medida de la actividad antioxidante, que se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. En esta reacción, la velocidad depende del pH, siendo lenta a pH ácido y rápida a pH básico. (3)

El reactivo utilizado, llamado reactivo de Folin-Ciocalteu, contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. (11) La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico, de color amarillo, en óxidos de tungsteno (W8O23) y de

molibdeno (MoO_4^{2-}), cromógenos de color azul intenso, siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo, y por tanto, de grupos fenólicos, de la molécula.

El análisis de la cantidad total de compuestos fenólicos, se realiza mediante la utilización de técnicas de espectrofotometría ultravioleta (UV) y visible (VIS). (2)

El estándar que se usa de referencia es el ácido gálico, que es un estándar satisfactorio dado que se obtiene puro fácilmente además de ofrecer una solubilidad satisfactoria, una adecuada estabilidad y un bajo precio. La respuesta obtenida con ácido gálico es equivalente a la mostrada con la mayoría de los otros compuestos polifenólicos en el vino y además, no se han revelado anomalías o problemas con su uso. (12) Para ello, es recomendable realizar una recta de calibrado utilizando ácido gálico.

El procedimiento siempre se realiza con los mismos reactivos, pudiendo variar según la bibliografía, la concentración y las condiciones de temperatura y tiempo de espera. Su esquema general es:

1. A una alícuota de vino diluido convenientemente añadir, en el siguiente orden: agua, reactivo Folin-Ciocalteu, agua de nuevo y Na_2CO_3 .
2. Esperar un tiempo determinado.
3. Medir la absorbancia a 750nm.
4. Calcular el índice de Folin-Ciocalteu. Para ello, la absorbancia obtenida se multiplica por varios factores según el tipo de vino.

$$\text{En el caso del tinto: } IFC = A_{750} \cdot \text{Factor de dilución (25)} \cdot 20$$

El factor 20 se emplea para obtener resultados equiparables al Índice de Polifenoles Totales (IPT). Si el resultado se quiere expresar en mg/L se tiene que interpolar la absorbancia en la recta de calibrado del patrón de ácido gálico preparado a distintas concentraciones.

$$\text{En el caso del blanco y rosado: } IFC = A_{750} \cdot 20$$

Se opera de la misma manera que en el caso anterior pero sin diluir el vino. (3)

La concentración total de compuestos polifenólicos en el vino varía entre 1.80 y 4.06 g/L equivalentes en ácido gálico, con un promedio de 2.57 g/L para vino tinto, y de 0.16 a 0.33 g/L, con un promedio de 0.24 g/L, para el vino blanco. (13)

4.1.1.2. Índice de polifenoles totales:

El fundamento de esta técnica analítica se basa en la obtención del índice por la medida de la absorbancia del vino a 280 nm por espectrofotometría, porque el núcleo bencénico característico de los compuestos polifenólicos tiene su máximo de absorbancia a esta longitud de onda. (14)

El procedimiento consiste en diluir la muestra de vino con un índice de 1:50, en agua destilada e introducirlo en la cubeta de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Se realiza la lectura de la absorbancia a 280 nm utilizando como blanco agua destilada. En el cálculo del índice se aplica la siguiente ecuación (15):

$$IPT = A_{280} \times 50$$

4.1.1.3.Nanopartículas de Cerio:

Estas partículas presentan propiedades catalíticas y redox, que se deben a su estado de oxidación reversible y esto hace que se pueda emplear para determinar antioxidantes. (16) Además, permiten obtener información de manera mucho más rápida y a bajo coste. Se pueden utilizar de diferentes maneras:

- Mediante un sensor electroquímico con estas nanopartículas inmovilizado sobre un electrodo. El Cerio induce la oxidación del compuesto a analizar y hace posible la detección de los antioxidantes.
- Aplicando las nanopartículas inmovilizadas sobre papel de filtro, tras lo que se añade la muestra diluida. Este método consiste en la reducción de las nanopartículas de óxido de Cerio por parte de los polifenoles, los cuales se traducen en cambio de color amarillo a marrón que puede ser observado a simple vista. El Cerio IV inmovilizado sobre el soporte sólido se reduce a Cerio III (marrón) con la presencia de polifenoles. Se mide la intensidad de la señal tras un tratamiento de datos de la imagen obtenida y por interpolación en la recta de calibrado se cuantifica la cantidad de polifenoles totales. (3)

4.1.2.Determinación de la composición de los distintos polifenoles

Las técnicas instrumentales para separar e identificar los compuestos fenólicos se basan principalmente en métodos cromatográficos en función del tiempo de retención, siendo necesaria la puesta a punto de un método para cada grupo de polifenoles. Estas técnicas tienen como ventaja la capacidad de distinguir entre moléculas isómeras, herramienta útil en la diferenciación de compuestos fenólicos con actividades antioxidantes diversas. (17)

4.1.2.1.Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC):

Es una técnica de análisis en la cual los componentes de una mezcla se separan a partir de las diferencias de velocidad a la que son transportados a través de una fase estacionaria por una fase móvil, líquida. Con este método se separan, identifican y cuantifican los polifenoles que forman parte del vino. Sin embargo es necesario realizar una extracción y/o separación previa de sus componentes antes de la introducción en el cromatógrafo, lo cual supone tiempos de espera elevados.

Se están empezando a investigar métodos cromatográficos más rápidos:

- Acoplamiento HPLC/MS:

La espectrometría de masas con ionización por electrospray (ES/MS) ha emergido como poderosa técnica de caracterización de biomoléculas y es la técnica de ionización más versátil que existe hoy en día. Se trata de la técnica analítica que mide la masa individual de átomos y moléculas.

Ofrece ventajas en términos de sensibilidad y capacidad para el análisis de un gran número de compuestos termolábiles, altamente polares y no volátiles. Esta técnica ha sido usada para la caracterización de antocianinas en diferentes extractos y acoplada a HPLC es muy poderosa para llevar a cabo dicha caracterización. (1)

- Cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC):

Es un avance de la HPLC. En ella hay una estrecha columna con partículas muy pequeñas y fases móviles que operan a muy altas presiones.

Sus ventajas respecto a HPLC son el alto rendimiento, la mejora de la resolución, menores tiempos de retención y una sensibilidad más alta. (18)

- Con una mínima preparación de muestra de vino, mediante una columna polar para fenoles y una columna específica para los compuestos carboxílicos, se obtienen en 30 minutos resultados para determinar los compuestos carboxílicos y fenólicos.

4.1.2.2. Espectrofotometría:

A pesar de que los métodos cromatográficos son los más usados y más precisos para determinar los distintos polifenoles en el vino, estos también se puede determinar, aunque la sensibilidad es menor, mediante espectrofotometría. La absorbancia debe ser medida a diferentes longitudes de onda, según el tipo de polifenol.

- Determinación de ácidos hidroxicinámicos: el fundamento de este ensayo se basa en la obtención del contenido de ácidos hidroxicinámicos por la medida de la absorbancia del vino a 320 nm (19). El procedimiento consiste en diluir la muestra con un factor de dilución de 1:100 y medir la absorbancia. El resultado de la absorbancia se multiplica por el factor de dilución: (15)

$$\text{Ác. Hidroxicinámicos} = A_{320} \times 100$$

- Determinación de antocianos: el fundamento de esta técnica analítica se basa en la decoloración mediante bisulfito de sodio, donde la decoloración es proporcional a la concentración de antocianos libres. (20) La absorbancia se mide a 520 nm. La concentración de antocianos totales viene dada según la siguiente ecuación: (15)

$$C_{\text{Antocianos}} (\text{mg/L}) = 875 \times (AA - AB)$$

- Determinación de flavonoles: El fundamento se basa en la obtención del contenido de flavonoles por la medida de la absorbancia del vino a 365 nm. (19) El procedimiento consiste en diluir la muestra con un factor de dilución de 1:100 y

medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 365 nm El resultado se obtiene con la siguiente ecuación: (15)

$$\text{Flavonoles} = A_{365} \times 100$$

- Determinación de taninos: este método se basa en la propiedad que presentan los taninos condensados de liberar en medio ácido y en presencia de calor, por rotura de los enlaces intermonoméricos, un carbón muy reactivo, que puede, por oxidación, dar lugar a una antocianidina. (21) El procedimiento consiste en preparar una dilución previa de la muestra de vino con un factor de dilución de 1:10. A partir de esta dilución se preparan dos tubos de ensayo que contengan muestra diluida, agua destilada y HCL. Uno de los tubos se incuba a 90°C. El otro tubo se deja a temperatura ambiente protegido de la luz. Cuando el primer tubo esté atemperado, se les añade a los dos, etanol y se mide la absorbancia a 550 nm. La concentración de taninos condensados se calcula mediante la siguiente ecuación: (15)

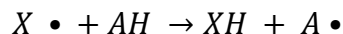
$$CT_{\text{taninos}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = 19,33 \times \frac{(AA - AB)}{5}$$

4.2.DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Estos métodos se basan en el uso de un sustrato susceptible de ser oxidado, un compuesto que actúa como oxidante y otro que actúa como antioxidante, capaz de recudir la oxidación del sustrato mediante su propia oxidación. Los distintos métodos difieren en el agente oxidante, el sustrato empleado, la técnica instrumental utilizada, en la medida del punto final y posibles interacciones de la muestra con el medio de reacción.

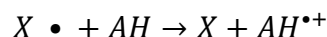
La capacidad antioxidante se puede llevar a cabo por dos posibles vías: (22)

- Reacciones de transferencia de un átomo de H (HAT)
En estas reacciones HAT, la reacción sería del siguiente tipo, siendo X• el radical libre y AH el antioxidante:



El nuevo radical formado es mucho más estable que el inicial.

- Reacciones de transferencia de un electrón (SET)
Por el contrario, en las reacciones SET el antioxidante transfiere un electrón para reducir un compuesto. Serían reacciones del siguiente tipo, siendo de nuevo X• el radical libre y AH el antioxidante:



Pero antes de realizar estos métodos, es necesario extraer los compuestos fenólicos de la matriz sólida en la que se encuentran. Serán estas disoluciones que contienen compuestos extraídos las que se analizan.

En general, este proceso se basa en una extracción sólido/líquido con disolventes orgánicos o la mezcla de algunos de ellos en relativa proporción (metanol, etanol, agua, acetato de etilo, propanol, acetona, dimetilformamida) obteniéndose en el extracto una mezcla de diferentes compuestos polifenólicos según su estudio de interés. El uso de este tipo de disolventes en las extracciones convencionales requiere una etapa final de purificación, siendo frecuente técnicas como la filtración o centrifugación. (23)

Además de los disolventes, el tiempo de extracción es determinante a la hora de obtener un mayor rendimiento ya que largos períodos pueden generar oxidaciones y en ocasiones es necesario minimizarlas con el uso de agentes reductores (24), siendo de uso frecuente el dióxido de azufre (su contenido está regulado por la autoridades pertinentes debido a efectos nocivos para la salud en dosis elevadas). (25)

Se recomienda que al menos dos de los ensayos que se citan a continuación se combinen para proporcionar una imagen fiable de la capacidad antioxidante total. (26)

4.2.1.Método DPPH

Este método se basa en la reducción de los radicales libres DPPH (SET) (2,2 -difencil-1-picrilhidrazil), debido a la transferencia de un electrón de un antioxidante (los polifenoles), que conduce a un descenso de la absorbancia a 515nm, lo que se traduce en una decoloración. Para analizar la capacidad antioxidante se utiliza la siguiente fórmula:

$$AE = \frac{1}{EC50 \times tEC50}$$

Siendo AE la eficacia antirradicalárica, EC50 la cantidad de antioxidante necesaria para reducir en un 50% la cantidad inicial de radical y Tec50, el tiempo necesario que necesita esa concentración para reducir en un 50% la cantidad inicial de radical. A mayor AE, mayor capacidad del antioxidante, pues este ejercerá su acción con menos concentración y menos tiempo. (20)

4.2.2.Método FRAP

Este método se utiliza para medir el poder reductor de una muestra (SET). Se basa en el aumento de absorbancia a 593 nm debido a la formación de complejos tripiridil-S-triazina con férrico (II) en presencia de un agente reductor. Los resultados se expresan como milimoles de Fe (II) según se indica en la siguiente ecuación. (15)

$$mM Fe(II) = 1.535 \times Dif A - 0.0137$$

4.2.3.Método HRSA

El método HRSA se basa en la actividad atrapadora de radicales hidroxilo. La Desoxirribosa (2 - desoxi-D-ribosa) se descompone cuando se expone a los radicales hidroxilo generados por la reacción de Fenton. (27) La MDA (malondialdehído) formada por la descomposición de la desoxirribosa se evalúa en la reacción con TBA y se mide la absorbancia del producto de reacción a 532 nm. El resultado se expresa como un porcentaje de inhibición en relación con una muestra de control (blanco). (15)

$$\% \text{ Inhibición} = [(A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{blanco}}] \times 100$$

4.2.4. Método TEAC (capacidad antioxidante en equivalentes de trolox)

Se trata de una reacción SET que se basa en la capacidad de los polifenoles de transferir un electrón al radical ABTS (ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), reduciéndolo y produciendo un descenso en la absorbancia a 658nm. Posteriormente, se establece una comparación entre el descenso de Trolox (solución patrón) con el antioxidante a analizar. (23)

El Trolox, puede usarse como recta patrón para expresar la capacidad antioxidante de los polifenoles en cualquiera de los ensayos antes nombrados.

4.2.5. Método CUPRAC

Se basa en una reducción cúprica (SET), usando el reactivo de cobre(II)-neocuproína como agente oxidante cromogénico.

La absorbancia de la mezcla del reactivo cúprico con la muestra de vino y de agua, se lee a 450nm. (27)

4.2.6. Método ORAC (oxygen radical absorbance capacity)

Mecanismo HAT basado en la medida de la disminución de la fluorescencia de la proteína fluoresceína como resultado de la pérdida de su conformación causado por una fuente de radicales peróxido tras sufrir daño oxidativo.

El método mide la capacidad de los antioxidantes en la muestra para proteger la proteína del proceso oxidativo. El mecanismo de la reacción se basa en la transferencia de un átomo de hidrógeno del antioxidante al radical libre. Por esto, se utiliza el radical iniciador, el AAPH, para generar el radical peroxil más estable. La pérdida de fluorescencia de la FL es el indicador de la extensión de la oxidación con el radical peroxil. (23)

4.2.7. Oxidación de las LDL's

Se trata de una reacción HAT. En este método se induce la oxidación de LDLs aisladas de distintos individuos mediante diferentes elementos y compuestos, como Cu²⁺ o AAPH y después se mide la absorbancia a 234 nm., a la cual absorben los dienos conjugados generados durante el proceso de oxidación de las LDLs.

La absorbancia se va modificando con el tiempo en tres fases: una lag-phase, en la que los dienos no se han comenzado a formar por la presencia de antioxidantes en la muestra y, por tanto, no aumenta; una fase de propagación, en la que aumenta de manera exponencial por la formación de dienos; y una fase de descomposición de los mismos, en la que la absorbancia tiende a bajar lentamente. (22)

Se han propuesto una gran cantidad de parámetros que se pueden medir en este ensayo, desde la comparación de la duración de la lag-phase entre un blanco y una muestra con antioxidante (en la que esta fase será más larga), la cantidad inicial de dienos conjugados, la cantidad máxima de los mismos otro parámetro, el CLT50, que mide la cantidad de antioxidante necesaria para aumentar la lag-phase en un 50 % respecto al control. (22)

5.RESULTADOS

MÉTODO	FOLIN-CIOCALTEU	SENSOR NPCERIO
Principio de funcionamiento	Reducción de fosfomolibdico para formar complejos azules.	Reducción del Cerio (donación de electrón y formación del complejo de transferencia de carga).
Instrumentos requeridos	Espectrofotómetro UV VIS	Filtro, óxido de cerio, escáner
Pasos, tiempo	7 pasos. Aprox 2h	1 paso. Aprox 10 min
Condiciones	No específico para fenoles (puede haber interferencias)	Poca muestra, dilución
Aplicación	Determinación de polifenoles totales en vinos y extractos.	Capacidad antioxidante, identificación de antioxidantes, IPT.

En la bibliografía podemos encontrar las diferencias entre los principales métodos de detección de polifenoles, las cuales se recogen en esta tabla.

En cuanto a los métodos de determinación de la capacidad antioxidante, se busca que sean capaces de: (22)

- Evaluar reacciones de transferencia de electrones y de átomo de hidrógeno.
- Especificar el sustrato de oxidación.
- Medir reacciones químicas que de hecho ocurran en reacciones potenciales, es decir, asegurar que el sustrato y el modo de inducir la oxidación son relevantes como fuentes de daño oxidativo.
- Ser sencillo.
- Tener un mecanismo y un punto final definido.
- Poseer una instrumentación más o menos disponible.
- Tener una buena reproducibilidad entre días.
- Ser adaptable para medir antioxidante hidrofílicos y lipofílicos.
- Usar distintas fuentes de radicales.
- Ser adaptable para análisis rutinarios a gran escala.

Sin embargo, la realidad es que no existe ningún método en la actualidad que reúna tales características y es difícil que llegue a ser posible evaluar la capacidad antioxidante de una muestra por un solo método, en vez de por la combinación de varios, como se hace en la actualidad.

6.CONCLUSIÓN

El estudio del vino ha aumentado de manera considerable en los últimos años, debido a que se ha demostrado sus beneficios gracias a su capacidad antioxidante, la cual le confieren los compuestos polifenólicos que posee. Asimismo, como se sabe que la gran mayoría de las enfermedades que están extendidas en nuestra sociedad, se deben a la oxidación de células y moléculas de nuestro organismo, cada vez se progresa en la investigación de métodos para

la cuantificación y caracterización de alimentos, en este caso el vino, que presenten actividad antioxidante.

La uva, y por consiguiente el vino, presenta una gran diversidad de compuestos fenólicos, de distintas estructuras químicas, cuya distribución en la uva y proporción en los distintos tipos de vinos, es diversa. Esto se debe, tanto a las condiciones de cultivo de la vid, como a los distintos métodos de elaboración del vino.

Tras haber estudiado los distintos métodos que existen para analizar estos compuestos y su capacidad antioxidante, hemos podido ver que no hay ninguno que sea capaz de analizar totalmente todas las características, sino que se necesita la combinación de varios de ellos. El método oficial de Folin-Ciocalteu, se está sustituyendo por otros métodos más modernos, todavía en investigación; como el sensor de Nanopartículas de Cerio. Esto se debe a que el método oficial tarda bastante en realizarse, lo que supone más coste, y además, ve su actividad limitada, pues solo sirve para determinar los polifenoles totales de una muestra de vino. En cambio, parece ser que los nuevos métodos que se están estudiando, además de poder ser realizados en un tiempo mucho menor, también sirven para la identificación individual de algunos antioxidantes.

En cuanto a la capacidad antioxidante, hay numerosos ensayos bastante sencillos capaces de determinarla, pero su utilidad es limitada debido a las diferentes maneras que tienen los antioxidantes de ejercer su acción. Si a esto añadimos, los diferentes tipos de compuestos polifenólicos presentes en una sola muestra y la sinergia que se puede dar entre ellos, no hay ningún ensayo capaz de determinar dicha actividad de manera fiable. Por ello, se necesita realizar varios, para ser capaces de determinar con éxito la capacidad antioxidante de una muestra.

En conclusión, el consumo del vino de manera moderada, (debido a que un exceso produciría el efecto adverso debido al alcohol) es beneficioso para la salud debido a la capacidad antioxidante de sus compuestos polifenólicos. Aún no se han descubierto los métodos perfectos para determinar estos compuestos, por lo que esto, sumado a su capacidad de reducir el riesgo de padecer enfermedades tan comunes y graves como el cáncer, el Alzheimer o muchas enfermedades coronarias, hace pensar que el estudio del vino seguirá en auge en los próximos años.

7.BIBLIOGRAFÍA

1. Rebolo López Sandra. Estudio de la composición polifenólica de vinos tintos gallegos con D.O: Ribeiro, Valdermorras y Ribeira Sacra. Lugo: Universidad de Santiago de Compostela Facultad de Ciencias Campus de Lugo; 2007.
2. Camussoni G, Carnevali E. Determinación comparativa del contenido de polifenoles en vinos tintos de origen argentino. *Invenio*.2004;151-159.
3. Cenus Tabita Ana. Determinación de polifenoles en vino mediante un sensor de nanopartículas de cerio. Valencia (SP): Universidad Politécnica de Valencia; 2016.
4. Xia E-Q, Deng G-F, Guo Y-J, Li H-B. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *Int. J. Mol. Sci.* 2010;11: 622-646.
5. Casares Faulín Ana Belén. Análisis de polifenoles en los vinos mediante técnicas de separación. Barcelona (SP): Universidad Politécnica de Catalunya; 2010
6. Neveu, V., Perez-Jimenez, J., Vos, F., Crespy, V., Du Chaffaut, L., Mennen, L., y otros. (2010). Phenol-Explorer: An Online Database on Polyphenol Contents in Foods. Database, DOI: 10. Recuperado el 10 de 05 de 2014, de Phenol-Explorer: <http://www.phenol-explorer.eu/reports/38>
7. P. Baardseth. Food additives and contaminants. 6, 201-207 (1989)
8. Chance B., Sies H., Boveris A. "Hydroperoxide metabolism in mammalian organisms" en *Physiol. Rev.* 1979, nº 59, pp. 527-605
9. Lizama V., Álvarez I., Peidró M.J., Alexandre J.L., Alexandre-Tudó J.L. (2015). Efecto del tipo de depósito sobre la evolución de los parámetros polifenólicos en vinos tintos. *Enología 2015*, grupos de investigación enológica, 16, 324,327.
10. A.J. Blasco, A. Gonzalez-Crevillen, M.C. González, A. Escarpa, *Electroanalysis*, 19, 2275-2286 (2007)
11. Peterson, G.L. (1979). Review of the Folin protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall, *Analytical biochemistry*. 100: 201-220
12. Singleton, V. L., Rossi, J. A. *Am. J. Enol. Vitic.* 16,144 (1965).
13. Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., Teissedre, P.L. *J. Agric. Food Chem.* 43, 890 (1995)
14. Zamora, F. (2003). Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos. AMV Ediciones
15. Canibaño Alberola Marta. Efecto del perfil fenólico sobre las características antioxidantes de vinos tintos. Palencia(SP): Escuela técnica superior de ingenierías agrarias de Palencia; 2012
16. Andrei V., Sharpe E., Vasilescu A., Andreescu S. (2016). A single use electrochemical sensor based on biomimetic nanocería for the detection of wine antioxidants. *Talanta*, 156-157, 112-118
17. Oroian M., Escriche I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*.2015;74:10–36
18. Jiménez Cordón Ana. Efecto matriz en la determinación de polifenoles en vino por UPLC-MS. La Rioja(SP): Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática de la Universidad de La Rioja; 2011
19. Andres-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R.M., Buxaderas, S., Torre-Boronat, M.C. (1997). Influence of variety and aging on foaming properties of cava (sparkling wine) – 2. *J Agric Food Chem.* 45: 2520-5
20. Ribereau-Gayon, P., Stonestreet, E., (1965). Le dosage des anthocyanes dans le vins rouge. *Bull. Soc.Chim.* 9: 2649-2652.

21. Bate-Smith, (1981). Astringent tannins of the leaves of Germaine species. *Phytochem.* 20: 211-216
22. Larrea Posadas Javier. Obtención de extractos polifenólicos a partir de uva para uso alimentario. Navarra (SP). Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Pública de Navarra; 2012.
23. Latorre Leal María. Polifenoles de la uva. Madrid (SP). Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid; 2016.
24. Arranz Martínez S. Compuestos polifenólicos (Extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: Metodología para su determinación e identificación. Tesis doctoral. Madrid: Universidad Complutense de Madrid;2010.
25. García-Guzmán J.J, Hernández-Artiga M.P., Palacios-Ponce de León L., BellidoMilla D. Selective methods for polyphenols and sulphur dioxide determination in wines. *Food Chemistry.*2015; 182:47–54.
26. Pérez-Jiménez J., Serrano J., Taberero M., Arranz S., Díaz-Rubio M., García-Diz L., Goñi I., Saura Calixto F. (2008). "Effects of grape antioxidant dietary fiber in cardiovascular disease risk factors". *Nutrition*, Vol. 24(7-8), pgs. 646-653.
27. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., Aruoma, O. I. (1987). The deoxyribose method: A simple, test-tube. assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.* 165: 215-219
28. Luna J., Garau M.C., Negre A., March J., Martorell A. Composición fenólica y actividad antioxidante de variedades minoritarias de vid de las Islas Baleares. Palma(SP): Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera.
29. Hurtado, I., P. Caldé, et al. (1997). "Antioxidative Capacity of Wine on Human LDL Oxidation in vitro: Effect of Skin Contact in Winemaking of White Wine." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(4): 1283-1289.