



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO:
MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA
DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES EN
EL VINO**

Autor: María Lluva Llord

Tutora: Dña. Laura Martín Carbajo

Convocatoria: Febrero 2019

ABREVIATURAS

ROS: especies reactivas de oxígeno

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

IFC: Índice de Folin-Ciocalteu

PFNE: polifenoles no extraíbles

MS: espectrometría de masas

ÍNDICE

1. Resumen	4
2. Introducción	5
▪ Proceso de oxidación celular. Papel de los antioxidantes en el organismo	
▪ Compuestos fenólicos o polifenoles: no flavonoides y flavonoides	
3. Objetivos	10
4. Material y métodos	10
Métodos de análisis de polifenoles	11
▪ Método Folin- Ciocalteu	
▪ Índice de polifenoles totales	
▪ Métodos cromatográficos	
▪ Electroforesis capilar	
▪ Sensores y nanotecnología	
5. Conclusión	16
6. Bibliografía	16

1. RESUMEN

Los polifenoles o compuestos fenólicos son antioxidantes que captan radicales libres y protegen al organismo de la oxidación celular. Se pueden clasificar en compuestos flavonoides y no flavonoides.

Las uvas destacan por tener un alto contenido en compuestos fenólicos. Durante todo el proceso de elaboración del vino se llevan a cabo reacciones químicas que van a modificar la composición fenólica.

En esta revisión bibliográfica se describen los compuestos fenólicos más importantes, indicando la forma en la que contribuyen a las características del producto (propiedades organolépticas, parámetros de calidad...).

Posteriormente, se exponen diferentes métodos analíticos utilizados para la detección y análisis de polifenoles en el vino, entre los que se encuentran los métodos espectrofotométricos, como el de Folin-ciocalteu; métodos cromatográficos y otras técnicas de reciente aparición, que surgen de la necesidad de mejora de los métodos anteriores y de un mayor interés por estos compuestos.

ABSTRACT

Polyphenols or phenolic compounds are antioxidants capable of scavenging free radicals and protect our organism from cellular oxidation. These can be classified in flavonoids and non-flavonoids.

Grapes are well known for their high content of phenolic compounds. During winemaking process, a series of chemical reactions take place, modifying its phenolic composition.

This review describes the most important phenolic compounds and their involvement in the product characteristics (organoleptical properties, quality parameters ...).

Subsequently, different methods used for the analysis and detection of polyphenols in wine are described, including spectrophotometric methods such as Folin-ciocalteu, chromatographic methods and some other more recent techniques responding to a development in this topic.

2. INTRODUCCIÓN

PROCESO DE OXIDACIÓN CELULAR. PAPEL DE LOS ANTIOXIDANTES EN EL ORGANISMO

Durante el metabolismo aerobio se generan en la célula especies derivadas de oxígeno. El anión superóxido, anión peróxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo son especies reactivas de oxígeno (ROS). Éstos se producen por reacciones de transferencia electrónica facilitada por la presencia de cationes metálicos (1).

Las ROS atacan a estructuras biológicas y producen daño oxidativo. Son responsables de la peroxidación de fosfolípidos de membranas biológicas y de actuar sobre el ADN fragmentando sus cadenas (2).

El organismo presenta diferentes mecanismos, enzimáticos y no enzimáticos que actúan como antioxidantes y permiten protegerlo del daño oxidativo.

Por una parte, enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa constituyen un mecanismo de defensa endógeno. Actúan evitando la formación de ROS (antioxidantes preventivos). Por otro lado, tenemos el glutatión, las vitaminas C y E y compuestos fenólicos. Son antioxidantes naturales que interrumpen la propagación de los procesos radicalarios en cadena (3).

Los radicales libres son átomos que tienen un electrón desapareado en su estructura, lo que les confiere una elevada reactividad e inestabilidad.

Cuando un radical libre capta un electrón de una molécula cercana, ésta se oxida y adquiere la condición de radical libre al quedarse con un electrón desapareado. De la misma manera, ésta nueva molécula reaccionará con otras para completar su par electrónico y ser estable. La formación de radicales libres se basa en una reacción en cadena (4).

Los antioxidantes son moléculas que ceden átomos de hidrógeno y de esta forma neutralizan los radicales libres.

Por su mecanismo de acción, los compuestos fenólicos se consideran potentes antioxidantes pues captan radicales libres y protegen al organismo de la oxidación celular (5). Esto es posible gracias a que los compuestos fenólicos presentan grupos hidroxilos, que actúan como donadores de hidrógeno.

La cesión de un átomo de hidrógeno del antioxidante (compuestos fenólicos) permite reaccionar con las ROS, rompiendo el ciclo de formación de radicales libres. Como resultado de esta interacción, el antioxidante queda unido al radical oxigenado, originándose un nuevo radical mucho más estable que el inicial: el anillo aromático del fenol con los dobles enlaces permite la deslocalización del electrón.

Los polifenoles o compuestos fenólicos son antioxidantes presentes en la naturaleza, que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas durante su desarrollo normal y como respuesta a situaciones comprometidas, como pueden ser el estrés, la exposición a radiación UV, infecciones o cambios en el medio ambiente (6) (1). Según su estructura podemos encontrar desde moléculas fenólicas simples hasta polímeros complejos de elevado peso molecular (7).

Las uvas presentan una amplia variedad de compuestos fenólicos entre su composición. Por ello, el vino y otros productos derivados de la uva presentan un elevado poder antioxidante.

En general, los compuestos fenólicos de la uva se encuentran en mayor proporción en la piel (células epidérmicas) y pepitas y, en menor medida; en la pulpa (8). La cantidad de compuestos fenólicos es más elevada en uvas tintas que en blancas debido a diferencias en cuanto a su obtención.

La particular importancia del vino tinto radica en las reacciones que se producen durante todo el proceso de elaboración, fermentación y envejecimiento del mismo (9). En definitiva, cambios químicos que serán responsables del contenido fenólico total del producto final.

Además del proceso de elaboración, otros factores que influyen en la cantidad y calidad de polifenoles son la variedad de uva, condiciones edafoclimáticas, técnicas de cultivo... (10).

Los compuestos fenólicos van a contribuir directamente en las propiedades sensoriales del vino, como el color, sabor, acidez, astringencia y aroma.

También, la madera de roble aporta sustancias volátiles y compuestos fenólicos al vino que van a repercutir en las características organolépticas. Algunos ejemplos pueden ser la acidez del ácido gálico; la neutralidad del elácido, el amargor y astringencia de flavonoles.... (11).

Pueden utilizarse también como parámetros de calidad en el proceso de elaboración del vino. Por ejemplo, la presencia de aldehídos aromáticos en vino es un indicativo de la fermentación y envejecimiento del vino en barricas de roble. (12). Por lo tanto, los compuestos fenólicos se consideran de gran importancia a la hora de evaluar la calidad del vino (13).

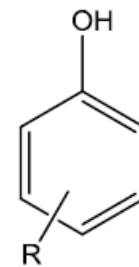
En este trabajo se busca describir los principales métodos analíticos utilizados para la determinación y cuantificación de polifenoles, los compuestos responsables de la actividad antioxidante del vino. Previamente se procede a describir cuales son los principales polifenoles que podemos encontrar tanto en las uvas como en el vino.

POLIFENOLES O COMPUESTOS FENÓLICOS

Químicamente hablando, los compuestos fenólicos se caracterizan por poseer en su estructura un anillo bencénico sustituido con al menos un grupo hidroxilo y una cadena lateral.

La capacidad antioxidante de estos compuestos va a depender del número y posición de los grupos hidroxilo, así como de la naturaleza de las sustituciones del anillo aromático (7).

Se pueden clasificar según la estructura química primaria del hidroxibenceno en no flavonoides y flavonoides (13).



Estructura básica de un fenol

COMPUESTOS NO FLAVONOIDES

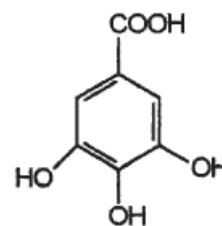
Dentro de los compuestos fenólicos no flavonoides encontramos los ácidos fenólicos y estilbenos. Algunos autores incluyen también los taninos hidrolizables en este grupo (6).

Los ácidos fenólicos se dividen en dos grupos: ácidos benzoicos (C6-C1) y ácidos cinámicos (C6-C9). Se encuentran fundamentalmente en forma de hidroxiacidos y pueden estar libres (forma minoritaria) o conjugados con ácidos orgánicos, como ácido tartárico y quínico o con azúcares.

Los ácidos benzoicos están compuestos por un fenol con un grupo carboxílico. Los más abundantes en *Vitis vinifera* son los ácidos p-hidroxibenzoico, protocatético, vanílico, gálico y sinérgico (14).

Destacar el ácido gálico por ser precursor de los taninos hidrolizables, aunque también lo vamos a ver en forma de éster en los taninos condensados.

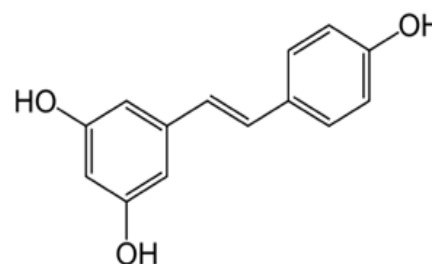
Además, es uno de los compuestos fenólicos cuyas características permanecen estables durante el proceso de envejecimiento del vino y puede detectarse por análisis cromatográfico. Se utiliza como patrón para expresar el contenido en fenoles.



Ácido gálico

Dentro de los **ácidos cinámicos** encontramos en el vino ácidos como el p-cumárico, cafeico, telúrico, sináptico. El ácido p-cumárico es un metabolito que promueve de forma indirecta la síntesis de flavonoides y estilbenos. Interviene también en reacciones de acilación de los antocianos.

Dentro de los **estilbenos** el resveratrol es el principal representante. Se encuentra de forma natural en las uvas, concretamente en los hollejos, producido como respuesta a una infección fúngica (*Botrytis cinerea*) u otros factores ambientales (15). Estudios in vitro han demostrado la actividad antifúngica del resveratrol en el cultivo de la vid (16) (17).

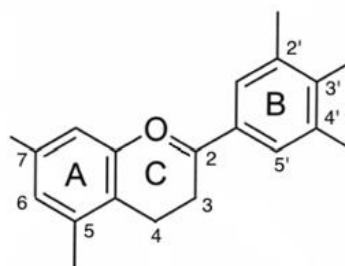


Resveratrol

Los **taninos hidrolizables** son polifenoles complejos formados por la esterificación de un ácido con un azúcar. Formados por ácidos como el gálico o hexahidroxidifenico y sus derivados, como el ácido elágico. Por medio de reacciones de hidrólisis (enzimáticas y no enzimáticas) y cambios en el pH se degradan en sus componentes correspondientes. Se denominan galotaninos aquellos de cuya hidrólisis resulta ácido gálico, y, elagitaninos; si resulta ácido elágico. (14) (18).

COMPUESTOS FLAVONOIDES

Según el grado de oxidación del anillo de pirano (anillo C) y los sustituyentes del heterociclo (anillo B), los compuestos fenólicos flavonoides se pueden dividir en: antocianos, flavanoles, flavonoles y flavonas.



Los **antocianos** son los compuestos que proporcionan color a las variedades tintas determinen la tonalidad que adquiere el vino. Una coloración azulada viene dada por los grupos hidroxilos; la coloración rojiza, por los grupos metoxilo. A mayor número de grupos funcionales, más intenso será el color.

Los antocianos en forma libre son muy inestables y son susceptibles de ser oxidados. Su degradación se manifiesta con la pérdida Estructura básica de compuestos flavonoides irreversible del color del vino. Por eso es tan importante proteger al vino de la luz y mantenerlo a temperaturas moderadas (19).

Los flavanoles (flavan-3-oles) están presentes principalmente en las pepitas de la uva en forma de monómeros, oligómeros (procianidinas) o compuestos poliméricos (proantocianidinas).

Las formas monoméricas mayoritarias son la (+) catequina y la (-) epicatequina, estereoisómeros entre sí. Otros monómeros son la galocatequina y epicatequina.

Una característica de los flavanoles es su alta reactividad para la polimerización. Por condensación de los monómeros se pueden formar procianidinas o moléculas de mayor tamaño denominadas proantocianidinas o taninos condensados (20).

En medio ácido pueden romperse las uniones entre los monómeros, liberando antocianidinas. (Las antocianidinas son las estructuras básicas de los antocianos).

Los taninos son el único grupo de compuestos fenólicos de relativamente elevado peso molecular que son capaces de asociarse fuertemente con carbohidratos y proteínas. Su estructura tridimensional con grupos hidroxilos en la superficie permite dicha interacción (21). Los taninos predominantes de manera natural son de tipo condensado, y se encuentran en la piel y pepitas de las uvas.

Las proantocianidinas o taninos condensados son responsables de la astringencia del vino y de su sabor amargo. Además, son capaces de precipitar proteínas. (20).

Son compuestos de gran importancia durante el envejecimiento del vino al participar en procesos de oxidación, condensación y polimerización.

Las combinaciones entre antocianidinas y procianidinas proporcionan al vino añejo la estabilidad suficiente para permanecer en barrica y conservar, entre otras, su color (10).

Los **flavanoles** proporcionan el color a la piel de las uvas blancas y son, en parte, responsables de la coloración amarilla característica de vinos blancos. En vinos tintos este color pasa desapercibido, pues el rojo de los antocianos es el que prevalece. Con respecto a las **flavonas**, mencionar la apogenina y luteonina.

Ambos flavanoles y flavonas representan una fracción minoritaria de compuestos fenólicos que encontramos en *Vitis vinífera*.

3. OBJETIVOS

El objetivo primario de este estudio es describir la naturaleza de los principales compuestos responsables de la actividad antioxidante del vino, así como los principales métodos analíticos utilizados para su determinación y cuantificación.

Otros objetivos secundarios son comparar la eficacia de los distintos métodos analíticos disponibles y destacar nuevas alternativas de reciente aparición.

4. MATERIAL Y MÉTODOS:

Para la elaboración de este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica tanto en soporte digital como en papel, con el fin de encontrar los principales compuestos responsables de la actividad antioxidante del vino y los métodos analíticos para detectarlos. Se han utilizado bases de datos especializadas, motores de búsqueda y publicaciones de revistas científicas (Medline, Pubmed, CIMA, Google Scholar, Bucea, etc). De apoyo complementario se han consultado libros de referencia en la materia.

La búsqueda bibliográfica se ha realizado en castellano e inglés, empleándose algunas palabras clave (‘‘antioxidantes’’, ‘‘métodos analíticos’’, ‘‘vino’’, ‘‘polifenoles’’) y diversas combinaciones de éstas. Se ha consultado información lo más actualizada posible, y se ha redactado el trabajo seleccionando fuentes publicadas del año 2010 en adelante.

MÉTODOS DE ANÁLISIS DE POLIFENOLES:

Método Folin- Ciocalteu

Se considera el método oficial de análisis de polifenoles y permite medir el contenido de compuestos fenólicos totales en productos naturales. Es una técnica cuantitativa y colorimétrica que utiliza el carácter reductor de estos compuestos.

El reactivo de Folin-Ciocalteu es un agente oxidante formado por una mezcla ácido fosfotúngstico (H₃ PW₁₂ O₄₀) y ácido fosfomolibdico (H₃ P Mo₁₂ O₁₄). Reacciona con los compuestos fenólicos del vino originándose complejos azules fosfomolibdico-fosfotungstico. Es una reacción de óxido reducción favorecida a pH básico.

La transferencia de electrones de los compuestos fenólicos reduce los complejos anteriores en óxidos de tungsteno (W₈₀ O₂₃) y de molibdeno (Mo₈ O₂₃), cromógenos de color azul intenso. La intensidad del color va a ser directamente proporcional al número de grupos hidroxilos de la molécula.

Estos complejos tienen un máximo de absorbancia a 760 nm y se pueden determinar de forma cuantitativa por espectrofotometría.

El contenido en fenoles totales se expresa como equivalentes de ácido gálico o como equivalentes de catequinas (mg ácido/ L). Para ello se realiza una recta de calibrado del ácido patrón donde se interpola la absorbancia obtenida espectroscópicamente.

Determinada la absorbancia se puede calcular el índice de Folin-Ciocalteu multiplicando el valor obtenido por una serie de factores que varían en función del tipo del vino. El IFC nos da un valor aproximado acerca del contenido total de PF, pero no acerca de los componentes individuales. Hoy en día se considera un método de escasa selectividad, porque otros compuestos reductores pueden contribuir a la señal analítica, y sobrevalorarse el contenido total en polifenoles.

Se procede de la siguiente manera: se diluye la muestra de vino (1:5) y se adiciona agua destilada. A continuación, se adiciona el reactivo y la solución de carbonato de sodio (20% p/v). Se enrasa con agua destilada y se agita. Pasados 30 minutos se considera que la reacción se ha estabilizado y se puede medir la absorbancia.

(2) (22) (23) (8) (24) (8) (25).

Índice de polifenoles totales

Todos los compuestos fenólicos absorben luz en la zona visible-ultravioleta. El núcleo bencénico de los compuestos polifenólicos tiene su máximo de absorbancia a 280 nm.

Para cuantificar los compuestos fenólicos totales se mide la absorbancia del vino (previamente diluido en agua purificada) a dicha longitud de onda. El valor obtenido por espectrofotometría será proporcional al número de fenoles. (23).

Métodos cromatográficos

Los métodos cromatográficos permiten la separación de los componentes de una mezcla compleja para su posterior identificación y determinación.

Las primeras técnicas analíticas que empezaron a utilizarse para la identificación y separación de compuestos fenólicos fueron la cromatografía en papel, cromatografía en capa fina y la cromatografía en columna.

Posteriormente, la llegada del HPLC revolucionó el estudio de los compuestos fenólicos en plantas por su alta resolución, sensibilidad, velocidad y naturaleza cuantitativa. Hoy en día es la técnica analítica más utilizada, pero solo permite la separación y cuantificación de compuestos fenólicos simples (polifenoles de baja masa molecular). La determinación de compuestos fenólicos de mayor masa molecular (polifenoles poliméricos) ha sido posible mediante la utilización de técnicas analíticas complejas más recientes, como HPLC-ESI-MS. Aún así, mucho queda por conocer acerca de las propiedades de estos polifenoles poliméricos (9).

En la HPLC, los compuestos de una mezcla (analitos) se separan al pasar a presión a través de una fase estacionaria (columna) transportados por una fase móvil o eluyente. Los analitos transportados por la fase móvil van a interaccionar de forma distinta con la fase estacionaria, adquiriendo diferentes velocidades de migración. Las separaciones van a depender del grado en el que los analitos se distribuyen entre las dos fases. Cuando utilizamos el mismo eluyente a lo largo de la cromatografía se dice que la elución es isocrática. En cambio, si vamos cambiando su composición a lo largo de la separación se denomina elución por gradiente. Esta última aporta una ventaja considerable al permitir la separación de compuestos de polaridades diferentes.

El hecho de trabajar a alta presión hace que los compuestos avancen con más rapidez a través de la columna, lo que se traduce en una mejor resolución de la cromatografía.

Respecto a la fase estacionaria (26) destaca en su tesis la ventaja que tiene utilizar columnas monocíticas en lugar de columnas convencionales, ya que se reducen los tiempos de retención y se mejoran la resolución cromatográfica.

Como sistema de detección de la separación se emplea con más frecuencia el detector UV-VIS-diodo array (DAP) y el detector UV-fluorescencia.

La cromatografía líquida es la técnica más utilizada para la separación de compuestos fenólicos que forman parte del vino. Este método, sin embargo, suele requerir una extracción y/o purificación previa de los componentes antes de la separación cromatográfica. En función del tipo de muestra y de la naturaleza de los compuestos a extraer se determina el tipo de disolvente y las condiciones de la extracción.

Atendiendo este último procedimiento aplicado a los polifenoles, pueden clasificarse en polifenoles extraíbles y polifenoles no extraíbles (PFNE). Los primeros se solubilizan en los disolventes y los segundos quedan retenidos en el residuo resultante de la extracción acuoso-orgánica. (27). los PFNE son polifenoles poliméricos que incluyen a las proantocianidinas no extraíbles de alto peso molecular y a los polifenoles hidrolizables (polifenoles de bajo peso molecular unidos a proteínas o polisacáridos, componentes de la pared celular).

Es complicado lograr una extracción completa, por lo que puede quedarse una cantidad de polifenoles retenida en el residuo de extracción. Esto justifica que existan datos acerca de los PF encontrados en extractos acuoso-orgánico, pero no sobre aquellos que permanecen en el residuo de extracción. (12) .

Hasta ahora, la cuantificación de PF no extraíbles se basaba únicamente en métodos espectrofotométricos). Por esta razón, algunos autores ponen de manifiesto la necesidad de análisis de los polifenoles no extraíbles mediante técnicas cromatográficas, y así tener un conocimiento completo del contenido de polifenoles. (21)

Comentar también que la separación por HPLC puede ir asociada a una caracterización estructural (cualitativa), para la cual es necesaria la espectrometría de masas (MS). La espectrometría de masas con ionizador por electro spray (ESI-MS) es una de las más utilizadas.

La MS es una técnica que nos proporciona información tanto cuantitativa como cualitativa.

La ESI utiliza energía eléctrica para que los iones en solución pasen a estado gaseoso. La ESI permite analizar iones en solución una sensibilidad elevada. En el interior de la fuente de ionización, la muestra en solución pasa a través de un capilar sobre el que se ha aplicado un voltaje. A continuación, la solución formada por gotas cargadas se dispersa en forma de spray. A medida que el solvente se evapora (con ayuda de una fuente de calor, por ejemplo), las gotas cargadas van reduciendo su tamaño mientras que la densidad de carga tiende a aumentar. El campo eléctrico generado en el interior de la gota llegará a un punto que provoque que los iones de la superficie se liberen a la fase gaseosa (28).

HPLC y ES-MS son técnicas que pueden acoplarse ya que ambas trabajan con muestras en solución. La principal aplicación de la HPLC-ESI-MS o cromatografía de líquidos de alto rendimiento con espectrometría de masas de tipo electro spray es la caracterización estructural de polifenoles altamente polimerizados.

Electroforesis capilar

Una técnica analítica alternativa para la separación y determinación de compuestos fenólicos en disolución es la electroforesis capilar.

Los analitos a separar se encuentran en un medio conductor electrolítico, que permite la conducción de la corriente por toda la disolución. Cuando se aplica una diferencia de potencial entre dos electrodos, situados cada uno en un extremo del capilar, se genera un campo eléctrico. La corriente aplicada hace que las moléculas catiónicas se muevan al polo negativo y, las aniónicas; al positivo. La velocidad de migración de un ión por un campo eléctrico será directamente proporcional a la movilidad electroforética del ion y a la intensidad del campo eléctrico generado.

La separación se basa en las diferencias en cuanto a la relación carga/tamaño de las moléculas. Cuanto mayor sea esta relación, mayor será la velocidad de migración del ión por el campo eléctrico.

Se trata de una técnica cuantitativa con gran poder de resolución y velocidad de análisis (presenta tiempos de análisis más bajos que en cromatografía de líquidos o de gases). Requiere poca cantidad de muestra y reactivos. Para que sea lo más efectiva posible, se utiliza una disolución tampón, de forma que los iones mantengan sus cargas constantes durante la separación.

(14) (29)

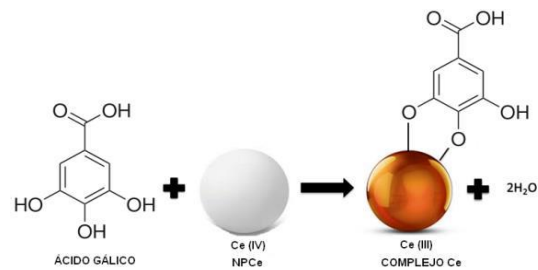
Sensores y nanotecnología

“El término nanotecnología, se originó en 1974 gracias al profesor Norio Taniguchi, de la Tokyo University of Science, en un artículo titulado ‘On the Basic Concept of Nanotechnology’, donde se describía la fabricación de materiales con precisión nanométrica. Aborda el diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas de control de forma y tamaño nanométricos. La nanotecnología, brinda la posibilidad de manipular la materia con átomos” (30).

Los avances en nanotecnología en los últimos años han permitido detectar antioxidantes utilizando sensores en papel con nanopartículas. Las nanopartículas de óxidos metálicos pueden utilizarse como indicadores inorgánicos colorimétricos (31).

Una de las aplicaciones de las nanopartículas de óxido de cerio (CeO_2) es su uso como biosensores (32). Ésta técnica utiliza nanopartículas de óxido de cerio inmovilizadas sobre un papel de filtro. Cuando entran en contacto con antioxidantes, se forman complejos de carga, estabilizados por puentes de hidrógenos entre los grupos hidroxilos de la superficie del cerio y las fibras de celulosa del papel.

El fundamento de esa técnica es una reacción redox: por transferencia del electrón del antioxidante, se reduce el Cerio IV a Cerio III. El cambio de estado de oxidación va acompañado de un cambio de color que se puede apreciar a simple vista. Para el ejemplo de reacción con el ácido gálico, se observa un cambio de color de amarillo a marrón. Cada compuesto reductor tendrá un color específico.



Reacción entre las NPCe y un polifenol (ácido gálico). Fuente: (25).

La intensidad del color obtenido nos permite determinar la capacidad antioxidante de la muestra. Para ello, se obtiene una imagen (por escáner) y se somete a un tratamiento de datos para ser analizada (Totallab, por ejemplo).

Requiere mínima instrumentación, es rápido y barato. Cantidad de muestra utilizada es pequeña, pero debe estar diluida. Este método permite identificar antioxidantes, determinar su capacidad antioxidante y calcular el IPT (25) (33).

Otros autores (26), (30) incluyen en su trabajo de investigación el reciente desarrollo de sensores electroquímicos con nanopartículas de oro para la detección de antioxidantes alimentarios.

5. CONCLUSIÓN

La mayoría de los trabajos sobre análisis de polifenoles se basan en la utilización de métodos cromatográficos, siendo las técnicas de HPLC las más habituales para separar y cuantificar polifenoles. No obstante, las ventajas de la electroforesis capilar la han convertido en una técnica cada vez más valorada en la industria alimentaria.

El interés de estos últimos años por el estudio de alimentos que presentan un alto contenido en antioxidantes ha permitido el desarrollo de nuevos métodos analíticos más eficaces, como la utilización de nanopartículas de metales para la determinación de polifenoles.

A lo largo de esta revisión bibliográfica se observa que es importante para el análisis de polifenoles realizar una correcta extracción de los compuestos, así como una identificación y cuantificación completa de los mismos.

6. BIBLIOGRAFÍA:

1. Baba SA, Malik SA. Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. *J Taibah Univ Sci* [Internet]. 2015;9(4):449–54. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1658365514001046>
2. Cabrera LTC, Dr. Daniel Sánchez Serrano. ALGUNOS ASPECTOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO, EL ESTADO ANTIOXIDANTE Y LA TERAPIA DE SUPLEMENTACIÓN. 2000;14(1):55–60. Available from: http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=2863748&_101_type=content&_101_groupId=2

3. euserbia muller tito K. “CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE FLAVONOIDES ENTRE LAS SEMILLAS DE CHIA NEGRA (salvia nativa) Y CHIA BLANCA (salvia hispánica L.). 2015;
4. Piña-Garza E, Huberman A, Chávez R, Lascurain R, Zenteno E, Piña E, et al. Los radicales libres. Beneficios y problemas. Gac Med Mex. 1996;132(2):183–203.
5. Urquiaga I, Leighton F. Wine and health: evidence and mechanisms. World Rev Nutr Diet [Internet]. 2005;95:122–39. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16151277
6. Meral R. Antioxidant effects of wine polyphenols. Trakia J Sci. 2008;6(1):57–62.
7. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chem. 2006;99(1):191–203.
8. Alberola MC. Efecto del perfil fenólico sobre las características antioxidantes de vinos tintos. 2012;
9. Li L, Sun B. Grape and wine polymeric polyphenols: Their importance in enology. Crit Rev Food Sci Nutr [Internet]. 2017;8398:1–17. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2017.1381071>
10. Valls J, Lampreave M, Nadal M, Arola L. Importancia de los compuestos fenolicos en la calidad de los vinos tintos de crianza. Aliment Equipos Y Technol. 2000;19(2):119–24.
11. Galllego Alvarez L. Estudio del potencial enológico de los productos de madera de rebollo (Quercus pyrenaica Willd.) autóctono de Castilla y León para la producción de vinos de calidad. 2013;
12. Arranz Martínez S. Compuestos Polifenólicos (Extraíbles Y No Extraíbles) En Alimentos De La Dieta Española : Metodología Para Su Determinación E Identificación . 2010.
13. Somkuwar RG, Bhange MA, Oulkar DP, Sharma AK, Ahammed Shabeer TP. Estimation of polyphenols by using HPLC–DAD in red and white wine grape

varieties grown under tropical conditions of India. *J Food Sci Technol* [Internet]. 2018;55(12):4994–5002. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s13197-018-3438-x>

14. Garrido J, Borges F. Wine and grape polyphenols - A chemical perspective. *Food Res Int* [Internet]. 2013;54(2):1844–58. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.002>
15. Püssa T, Floren J, Kuldkepp P, Raal A. Survey of grapevine *Vitis vinifera* stem polyphenols by liquid chromatography-diode array detection-tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2006;54(20):7488–94.
16. Apolonio-Rodríguez I, Franco-Mora O, Salgado-Siclán M, Aquino-Martínez J. In vitro inhibition of *Botrytis cinerea* with extracts of wild grapevine (*Vitis* spp.) leaves. *Rev Mex Fitopatol*. 2017;35:170–85.
17. Rodríguez J. Máster en Calidad, Innovación y Desarrollo de alimentos. 2013;28.
18. Koponen JM, Happonen AM, Mattila PH, Törrönen AR. Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *J Agric Food Chem*. 2007;55(4):1612–9.
19. Casares AB. Análisis de polifenoles en los vinos mediante técnicas de separación. Proy Fin Carrera. 2010;
20. Valencia E, Ignacio I, Aviles E, Bartolomé M, Martínez H, García M. Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas Polyphenols: antioxidant and toxicological properties. *Rev la Fac Ciencias Químicas Cuenca* [Internet]. 2016;15–29. Available from:
<http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/29781/1/2.1583-4794-2-PB.pdf>
21. Serrano J, Puupponen-Pimiä R, Dauer A, Aura AM, Saura-Calixto F. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53(SUPPL. 2):310–29.
22. Isaza JH. Estimación espectrofotométrica de fenoles totales en especies de la familia melastomataceae. 2005;27:75–9.
23. Xoán Lois Elorduy Vidal. CARACTERIZACIÓN DE VINOS TINTOS DE

VARIAS DENOMINACIONES DE ORIGEN CATALANAS EN BASE A LOS VINOS PRESENTES EN EL MERCADO. DO TARRAGONA, DO CONCA DE BARBERÀ Y DOQ PRIORAT [Internet]. Vol. 205, British Journal of Psychiatry. 2014. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007125000277040/type/journal_article

24. Siddiqui N, Rauf A, Latif A, Mahmood Z. Spectrophotometric determination of the total phenolic content, spectral and fluorescence study of the herbal Unani drug Gul-e-Zoofa (*Nepeta bracteata* Benth). J Taibah Univ Med Sci [Internet]. 2017;12(4):360–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtumed.2016.11.006>
25. Cenusa TA, Aragón Revuelta P, Noguera Murray P. Determinación de polifenoles en vinos mediante un sensor de nanopartículas de cerio. 2016;
26. Andreu Navarro Á. NEW ANALYTICAL METHODOLOGIES FOR FOOD ANTIOXIDANT. tesis Dr. 2011;
27. Arranz S, Silván JM, Saura-Calixto F. Nonextractable polyphenols, usually ignored, are the major part of dietary polyphenols: A study on the Spanish diet. Mol Nutr Food Res. 2010;54(11):1646–58.
28. CS Ho, CWK Lam, MHM Chan, RCK Cheung, LK Law, LCW Lit, KF Ng, MWM Suen and HT. ESI_MS: Principles and Clinical Applications. Clin Biochem Rev [Internet]. 2003;24(February):3–12. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1853331/pdf/cbr24_1p003.pdf
29. Francisco Gonzalez. Caracterización de compuestos fenólicos presentes en la semilla y en el aceite de chia (*Salvia hispanica* L.), mediante electroforesis capilar. 2010;113.
30. González Antón R. Síntesis de nanopartículas de oro funcionalizadas con 1-dodecanotiol en un sistema bifásico . Desarrollo de sensores electroquímicos . 2016;1–176.
31. Sharpe E, Andreescu S. Integration of nanoparticle-based paper sensors into the classroom: An example of application for rapid colorimetric analysis of antioxidants. J Chem Educ. 2015;92(5):886–91.

32. Vega-Garita V, Matamoros-Quesada J, Vega-Baudrit J. Síntesis de CeO₂ : propiedades del sol-gel y caracterización de las nanopartículas obtenidas
Synthesis of CeO₂ : sol-gel properties and characterization of the obtained nanoparticles. 2014;(506).
33. Andrei V, Sharpe E, Vasilescu A, Andreescu S. A single use electrochemical sensor based on biomimetic nanocerium for the detection of wine antioxidants. *Talanta* [Internet]. 2016;156–157:112–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.04.067>