Universidad Pública de Navarra
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y BIOCIENCIAS

NEKAZARITZAKO INGENIARITZAKO ETA BIOZIENTZIETAKO GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA

VALIDACIÓN DE MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA DETERMINAR LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y EL CONTENIDO FENÓLICO DE DIFERENTES MATRICES ALIMENTARIAS

presentado por

NURIA GAYARRE OVIDE

aurkeztua

GRADO EN INNOVACIÓN DE PROCESOS Y PRODUCTOS ALIMENTARIOS

GRADUA ELIKAGAI PROZESU ETA PRODUKTUEN BERRIKUNTZAN

Mayo, 2022 / *Urtea, hilabetea*

ÍNDICE

Resumen **7**

Abstract **7**

1. Introducción **8**

1.1. Especificidad *10*

1.2. Linealidad *11*

1.2.1. Análisis de la varianza: ANOVA 11

1.2.2. Test de linealidad 11

1.3. Precisión, exactitud y recuperación *12*

1.4. Límites de detección y cuantificación *12*

1.5. Estabilidad *12*

2. Objetivos **13**

3. Materiales y métodos **14**

3.1. Muestras *14*

3.2. Métodos de determinación de capacidad antioxidante *15*

3.2.1. ABTS 15

3.2.2. DPPH 16

3.2.3. FRAP 16

3.2.4. Método de determinación del contenido fenólico total 17

3.2.5. Método de determinación del contenido de flavonoides 18

3.2.6. Antocianinas 19

3.3. Procedimiento de validación *20*

3.3.1. Evaluación de la especificidad 20

3.3.2. Evaluación estadística de la linealidad 21

3.3.3. Precisión, exactitud y recuperación 24

3.3.4. Límites de detección y cuantificación 25

3.3.5. Estabilidad 25

4. Resultados y discusión **26**

4.1. Validación de los métodos analíticos *26*

4.1.1. Especificidad 26

4.1.2. Linealidad 26

4.1.3. Precisión y exactitud 36

4.1.4. Límites de detección y cuantificación 40

4.1.5. Estabilidad de la disolución madre 42

4.2. Muestras de vino *43*

5. Conclusiones **47**

6. Bibliografía **48**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relación entre la absorbancia y concentración de Trolox en ABTS (a), DPPH (b) y FRAP (c); Relación entre la concentración de ácido gálico en Folin-Ciocalteu (d) y concentración de quercetina en $AlCl_3$ (e) ... 31

Figura 2. Gráficos de homocedasticidad con los métodos ABTS (a), DPPH (b), FRAP (c), Folin-Ciocalteu (d) y $AlCl_3$ (e) 32

Figura 3. Concentración de las distintas muestras en ABTS 44

Figura 4. Concentración de las distintas muestras en DPPH 44

Figura 5. Concentración de las distintas muestras en FRAP 44

Figura 6. Concentración de las distintas muestras en Folin-Ciocalteu 45

Figura 7. Concentración de las distintas muestras en $AlCl_3$ 45

Figura 8. Pigmentos de antocianinas 46

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Clasificación de los polifenoles de origen natural (Shahidi & Ambigaipalan, 2015) 9

Imagen 2. Espectrofotómetro UV visible JENWAY modelo 7315 14

Imagen 3. Reacción de formación del radical ABTS (Mercado Sánchez, 2010) 15

Imagen 4. Método ABTS 15

Imagen 5. Reacción de transferencia de electrones en el método DPPH (Schaich et al., 2015) 16

Imagen 6. Método DPPH 16

Imagen 7. Transferencia de electrones en FRAP (Huang et al., 2005) 16

Imagen 8. Método de FRAP 17

Imagen 9. Reducción del reactivo FC (Diez de la Iglesia, 2018) 17

Imagen 10. Método Folin-Ciocalteu 17

Imagen 11. Reacción de formación del complejo flavonoide-$AlCl_3$ (Makuasa & Ningsih, 2020) 18

Imagen 12. Método $AlCl_3$ 18

Imagen 13. Resultado muestras de vino con el método de las antocianinas 19

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diseño experimental de las muestras de vino 14

Tabla 2. Rango de concentración, controles y límite de cuantificación 20

Tabla 3. Fórmulas para realizar el análisis de la variancia 22

Tabla 4. Resultados de calibración del método ABTS en el rango de concentraciones de 0,1 a 2 mM de Trolox 27

Tabla 5. Resultados de calibración del método DPPH en el rango de concentraciones de 0,1 a 0,65 mM de Trolox 27

Tabla 6. Resultados de calibración del método FRAP en el rango de concentraciones de 0,05 a 0,9 mM de Trolox 28

Tabla 7. Resultados de calibración del método Folin-Ciocalteu en el rango de concentraciones de 0,4 a 4 mM de ácido gálico 29

Tabla 8. Resultados de calibración del método $AlCl_3$ en el rango de concentraciones de 3 a 30 ppm de quercetina 29

Tabla 9. Tests estadísticos para el análisis de la varianza de ABTS 33

Tabla 10. Tests estadísticos para el análisis de la varianza de DPPH 33

Tabla 11. Tests estadísticos para el análisis de la varianza de FRAP 33

Tabla 12. Tests estadísticos para el análisis de la varianza de Folin-Ciocalteu 34

Tabla 13. Tests estadísticos para el análisis de la varianza de $AlCl_3$ 34

Tabla 14. Coeficientes de variación (%) de los factores de respuesta de los distintos métodos 35

Tabla 15. Resultados de la determinación de la significación estadística de la desviación estándar de la pendiente 35

Tabla 16. Resultados de repetibilidad y exactitud intra-día, obtenidos en cada día de validación en ABTS .. 36

Tabla 17. Resultados de repetibilidad y exactitud intra-día, obtenidos en cada día de validación en DPPH . 36

Tabla 18. Resultados de repetibilidad y exactitud intra-día, obtenidos en cada día de validación en FRAP .. 37

Tabla 19. Resultados de repetibilidad y exactitud intra-día, obtenidos en cada día de validación en Folin-Ciocalteu 37

Tabla 20. Resultados de repetibilidad y exactitud intra-día, obtenidos en cada día de validación en $AlCl_3$ .. 37

Tabla 21. Resultados de precisión intermedia y exactitud inter-día en ABTS 38

Tabla 22. Resultados de precisión intermedia y exactitud inter-día en DPPH..... 38

Tabla 23. Resultados de precisión intermedia y exactitud inter-día en FRAP 38

Tabla 24. Resultados de precisión intermedia y exactitud inter-día en Folin-Ciocalteu..... 38

Tabla 25. Resultados de precisión intermedia y exactitud inter-día en $AlCl_3$ 39

Tabla 26. Datos del porcentaje de recuperación y coeficiente de variación en todos los métodos 40

Tabla 27. Límites de detección en todos los métodos ensayados 40

Tabla 28. Resultados de exactitud y precisión del límite de cuantificación para ABTS 40

Tabla 29. Resultados de exactitud y precisión del límite de cuantificación para DPPH 41

Tabla 30. Resultados de exactitud y precisión del límite de cuantificación para FRAP 41

Tabla 31. Resultados de exactitud y precisión del límite de cuantificación para Folin-Ciocalteu 41

Tabla 32. Resultados de exactitud y precisión del límite de cuantificación de $AlCl_3$ 42

Resumen

Hoy en día, hay una gran preocupación sobre el medioambiente y la sostenibilidad por parte de los consumidores, incrementando así la tendencia por los productos naturales. En la industria agroalimentaria se producen numerosos desechos de materias primas que se pueden aprovechar. Un ejemplo de ello, son los raspones de uvas, los cuales contienen numerosos compuestos fenólicos y otros antioxidantes.

Las nuevas líneas de investigación han puesto atención en este subproducto para utilizarlo como sustitutivo del conservante y antioxidante comúnmente utilizado en la industria vitícola, el dióxido de azufre. Este conservante a pesar de sus beneficios es toxico y causa alergia en algunas personas con sensibilidad a este compuesto, por ello es necesario reducir su uso.

Para evaluar el efecto de los sustitutos del dióxido de azufre es conveniente analizar la capacidad antioxidante del vino además de los parámetros habituales de caracterización. Para obtener resultados fiables y concluyentes es conveniente que los métodos espectrofotométricos que se utilizan para analizar los vinos estén validados.

Por ello, en este trabajo se realiza la validación de cinco métodos espectrofotométricos que se utilizan de manera habitual en el laboratorio para caracterizar tanto extractos vegetales como muestras de vino.

Palabras clave: antioxidantes, métodos espectrofotométricos, contenido fenólico, raspones, validación

Abstract

Nowadays, there is a great concern for the environment and sustainability on the part of consumers, thus increasing the trend for natural products. In the agri-food industry, there is a lot of waste that can be used. An example of this is grape stems, which contain numerous phenolic compounds and other antioxidants.

The new lines of research have paid attention to this by-product to use it as a substitute for the preservative and antioxidant commonly used in the wine industry, sulfur dioxide. Despite its benefits, this preservative is toxic and causes allergy in some people with sensitivity to this compound, so it is necessary to reduce its use.

To evaluate the effect of sulfur dioxide substitutes, it is convenient to analyze the antioxidant capacity of the wine in addition to the usual characterization parameters. In order to obtain reliable and conclusive results, the spectrophotometric methods used for the analysis should be validated.

Therefore, in this work the validation of five spectrophotometric methods commonly used in the laboratory to characterize both plant extracts and wine samples is carried out.

Key words: antioxidants, spectrophotometric methods, phenolic content, grape stems, validation

1. Introducción

Hoy en día hay una gran preocupación sobre el medioambiente y la sostenibilidad, además de una tendencia de los consumidores por los productos naturales. A nivel de las industrias agroalimentarias, se producen numerosos desechos de materias primas, sobre los que se han realizado estudios donde se ha comprobado que se pueden aprovechar con otras finalidades. En este sentido, la Comisión Europea ha definido el desperdicio de alimentos como una de las áreas prioritarias del Plan de Acción para la Estrategia Europea de Economía Circular (Intergovernamental Panel on Climate Change, 2014) y el Gobierno de Navarra ha diseñado el Plan de residuos de Navarra 2017-2027 en base a dos pilares fundamentales: el Plan de Gestión y el Programa de Prevención. El Plan de Gestión engloba todas las actividades cuya finalidad es recoger, separar, preparar para reutilizar, reciclar y valorizar y, finalmente, eliminar los residuos generados, mientras que el objetivo del Programa de Prevención es reducir la cantidad de residuos generados en Navarra.

Entre las distintas estrategias para la gestión de residuos alimentarios que existen, habitualmente se distinguen, por un lado, las prácticas convencionales que permiten la obtención de biogás, compost, energía…, y por otro, los métodos de valorización emergentes que persiguen obtener productos con valor añadido a partir de estos residuos (Jiménez-Moreno et al., 2020).

Uno de los compuestos con mayor valor presente en los subproductos vegetales procedentes de las industrias son los antioxidantes, los cuales tienen numerosas propiedades tanto a nivel de conservación de los productos alimentarios como en la salud de los consumidores. Por ello, parece muy interesante extraer este tipo de compuestos de los residuos industriales y aprovecharlos ya sea como ingredientes funcionales en la industria alimentaria, como nutracéuticos o, incluso, como principios activos en la industria farmacéutica o biomédica.

Concentraciones elevadas y tolerables de antioxidantes como las vitaminas C y E tienen efectos beneficiosos en salud, como prevención o paliación de cáncer, enfermedades cardiovasculares, infecciones e inflamaciones. A nivel de conservación de los alimentos, los antioxidantes pueden retardar la oxidación de los lípidos, manteniendo las características organolépticas del producto, además de reducir también la oxidación de las proteínas (Sindhi et al., 2013).

La actividad antioxidante de los vegetales se debe principalmente a la presencia de flavonoides, antocianinas y otros compuestos fenólicos (Sindhi et al., 2013). Los compuestos fenólicos provienen del metabolismo secundario de las plantas, protegiendo algunos de sus órganos de la oxidación. Se pueden encontrar incluso en las semillas, hojas y cortezas de los distintos vegetales (Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

Los compuestos fenólicos son antioxidantes primarios, debido a que eliminan los radicales libres y retrasan o inhiben la iniciación o propagación de la oxidación de los lípidos. Su potencial antioxidante depende del número y posición de los grupos hidroxilos, ya que estos pueden donar átomos de hidrógeno a los radicales, produciendo derivados lipídicos y radicales antioxidantes que son más estables y menos disponibles para la autooxidación (Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

La clasificación de estos compuestos se puede realizar de distintas maneras, en este caso se analizan desde la división de naturales o sintéticos, centrándose en los naturales (Imagen 1).

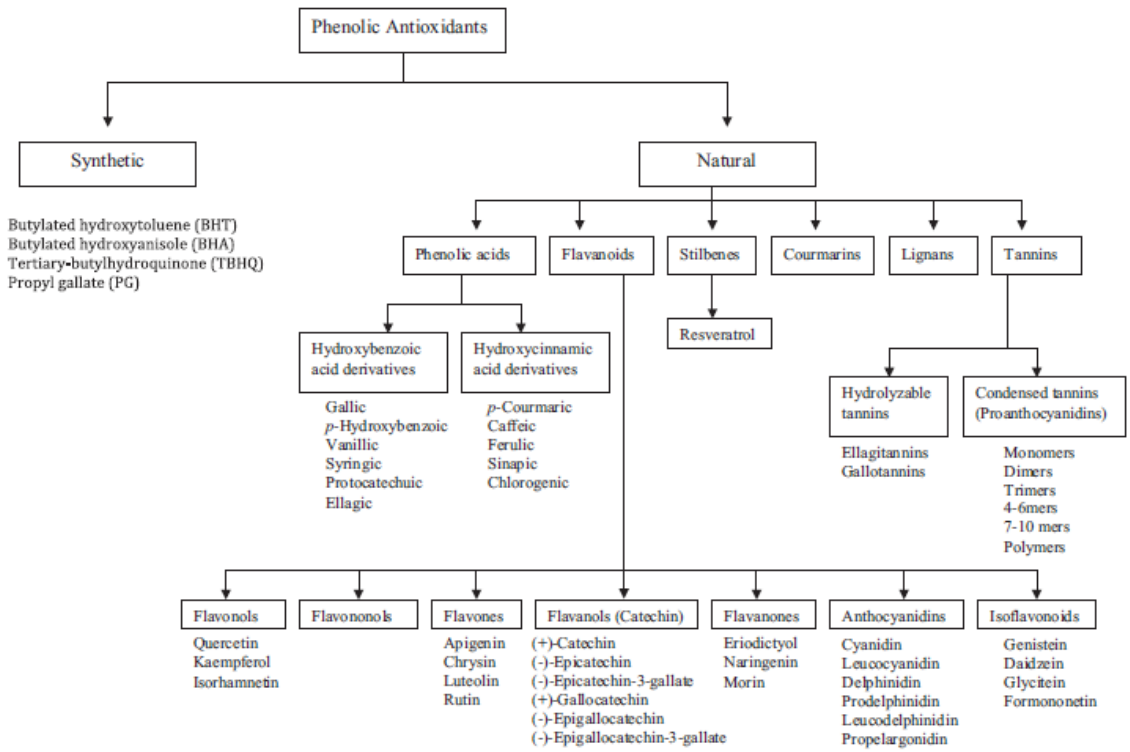

Imagen 1. Clasificación de los polifenoles de origen natural (Shahidi & Ambigaipalan, 2015)

Los ácidos fenólicos predominantes en los compuestos vegetales son los derivados del ácido hidroxibenzoico, y los derivados del ácido hidoxicinámico, siendo estos últimos los más comunes.

Los flavonoides están divididos en 7 grupos, dentro de los flavonoles, se encuentra la quercetina, antioxidante que se usa en el método $AlCl_3$ para medir la concentración de flavonoides. Por otro lado, las flavononas pueden verse afectadas por una serie de cambios en su anillo, dando lugar a las antocianinas, compuestos que dan el color característico del vino tinto.

Dentro de los estilbenos está el resveratrol, este es producido por las plantas como respuesta a daños, sobre todo en las vides. El aporte mayoritario de resveratrol se da con el consumo del vino tinto.

Finalmente, el grupo de los taninos también es de interés en este trabajo, ya que una fuente importante de proantocianidinas (también llamadas taninos condensados) es el vino. La división de los taninos en hidrolizables o condensados depende de su estructura química, siendo los condensados derivados de flavan-3-oles, y los hidrolizables del ácido gálico (Shahidi & Ambigaipalan, 2015). El ácido gálico se utiliza como antioxidante en el método de Folin-Cioclateu para analizar la composición de compuestos fenólicos totales.

Teniendo en cuenta el gran valor en compuestos bioactivos que poseen ciertos subproductos vegetales de la industria, se ha puesto atención en los raspones de uva como fuente de productos innovadores y con valor añadido en el sector vitivinícola. Los raspones de uva suponen entre el 1,4 – 7,0% de la materia prima procesada en bodega (Souquet et al., 2000), y actualmente es el subproducto vitivinícola más infrautilizado.

En el trabajo de Esparza et al. (2021) se estudió cómo las distintas variedades de uvas y el año de vendimia influían en la composición fenólica de raspones de diferentes variedades de uva. A partir de los resultados obtenidos en ese trabajo, se escogieron 2 raspones de variedades diferentes de uva con la finalidad de obtener extractos que pudieran utilizarse para sustituir total o parcialmente el dióxido de azufre añadido al vino en el proceso de vinificación.

El dióxido de azufre es el conservante y antioxidante que se utiliza habitualmente en bodega para mantener el vino en óptimas condiciones, ya que evita la oxidación del vino, el pardeamiento por inactivación de enzimas como la polifenoloxidasa, es antimicrobiano, disuelve compuestos fenólicos y aporta propiedades organolépticas. Pero presenta algunos inconvenientes que hacen necesario disminuir su uso. Es un compuesto toxico y causante de alergias en personas sensibles, y en exceso puede llegar a disminuir la calidad del vino (Martínez-Inda, 2019).

En vista del desarrollo actual de la línea de investigación de aprovechamiento de residuos agroalimentarios para la obtención de extractos con aplicación en distintos sectores industriales, es muy necesario tener métodos fiables que permitan medir la capacidad antioxidante y la composición fenólica tanto de los extractos obtenidos a partir de residuos alimentarios como de diferentes matrices alimentarias a las que se les puede añadir estos extractos.

Por ello, en este trabajo se ha realizado la validación de 5 métodos espectrofotométricos que se utilizan habitualmente en el laboratorio para caracterizar tanto extractos vegetales como muestras de vino.

Para determinar la capacidad antioxidante no existe un único método universal, por lo que se han utilizado tres métodos basados en diferentes mecanismos de acción que son ABTS, DPPH y FRAP. Para medir el contenido fenólico total, se utilizó el método de Folin-Ciocalteu, y para la determinación del contenido de flavonoides, el método de $AlCl_3$.

La validación de un método, como se define según la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (2001, p.17), es "el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos."

La validación de métodos analíticos es necesaria por varios motivos. Por un lado, proporciona confianza en el método y en los resultados que se obtienen. Además, permite conocer el método en profundidad y disminuir el número de fallos y repeticiones, reduciéndose los costes y el tiempo empleado.

A la hora de validar un método hay que definir algunos parámetros de validación que deben cumplir ciertos criterios para para verificar su fiabilidad. Estos parámetros son (AEFI, 2001):

1. Especificidad
2. Linealidad y rango
3. Precisión
4. Exactitud
5. Límite de cuantificación y límite de detección

A continuación, se van a definir brevemente estos parámetros y los criterios que han de cumplir para que la validación sea eficaz.

1.1. Especificidad

La especificidad es la capacidad para identificar los analitos de interés en presencia de otras sustancias que puedan estar en la muestra (AEFI, 2001). Es decir, si el método puede distinguir el analito de todo los demás que hay en la muestra. No siempre es posible demostrar que un procedimiento analítico es específico para un analito en particular. En esos casos, es conveniente combinar los resultados de especificidad con otros procedimientos analíticos para alcanzar el nivel de discriminación adecuado.

1.2. Linealidad

La linealidad se define como la capacidad de un método analítico para generar unos resultados linealmente proporcionales a la concentración de analito de la muestra. La condición de linealidad se puede comprobar a partir de diferentes parámetros como la ecuación de la recta de calibrado, los coeficientes de correlación (R) y de determinación (R^2), los coeficientes de variación de los factores de respuesta y la suma de cuadrados de los residuales (AEFI, 2001).

El modelo de regresión lineal permite comprobar si existe una relación de dependencia entre una variable independiente (concentración) y una variable dependiente (absorbancia) (AEFI, 2001). Para ello, se utiliza una ecuación matemática que permite relacionar ambas variables junto con un término aleatorio. La recta que se forma al enfrentar las variables se calcula por el método de mínimos cuadrados. Este método minimiza la diferencia existente entre los valores teóricos o de referencia y los estimados por la ecuación, es decir, el componente aleatorio.

La ecuación de la recta relaciona la respuesta instrumental (absorbancia, en este caso) que produce un analito con las concentraciones del mismo. Esta es: $Y = bx + a$. Siendo b, la pendiente; a, el término independiente y X, la concentración del analito (AEFI, 2001).

La pendiente de la recta está relacionada con la sensibilidad del método. Así, a mayor valor de la pendiente, mayor sensibilidad tiene el método. Por su parte, el término independiente está relacionado con el error sistemático (AEFI, 2001).

La suma de los cuadrados de los residuales es la suma de todos los términos aleatorios de los datos con los que se ha construido la ecuación de la recta (AEFI, 2001). Por ello, cuanto menor sea este valor, menos interferencia del azar habrá en el método, y mayor será su fiabilidad.

El coeficiente de correlación (R) indica el grado de relación entre la variable X (concentración) y la variable Y (absorbancia). Para comprobar la linealidad del método, es necesario también calcular el coeficiente de determinación (R^2) ya que aporta una mayor significación estadística al expresar la proporción de la variación total de Y explicada por el método (AEFI, 2001).

Otro parámetro importante para determinar la linealidad del método analítico es la homocedasticidad del modelo de regresión. Para que los métodos sean lineales, las varianzas de los residuales deben ser homogéneas, es decir, la diferencia entre el valor experimental y el valor estimado a partir de la recta de regresión debe ser similar en todos los casos (AEFI, 2001).

1.2.1. Análisis de la varianza: ANOVA

Sirve para comparar las varianzas ente los promedios de diferentes grupos. Para ello, se debe cumplir que los valores residuales sigan una distribución normal y la homocedasticidad de las varianzas. Esto se comprueba realizando un test de normalidad y el test de Cochran.

Cuando se cumplen ambos criterios se puede proceder a realizar el ANOVA, a partir de los valores F1 y F2 calculados con las distintas sumas de cuadrados de las diferencias entre los componentes de una serie y su media (AEFI, 2001).

1.2.2. Test de linealidad

El test de linealidad es otra forma de confirmar la linealidad de los métodos. Se puede realizar a partir del coeficiente de variación de los factores de respuesta (F), el cual expresa la relación entre la absorbancia y la concentración. Estos factores muestran la sensibilidad del método, es decir la capacidad para detectar bajas concentraciones de analito. Los valores obtenidos deben ser similares por tanto a la pendiente de la recta y

ser muy similares unos a otros (presentar un coeficiente de variación bajo). Otra forma de estimar la linealidad es con la significación estadística de la desviación estándar de la pendiente, que se realiza con la prueba t de Student. La prueba permite conocer si un valor es significativamente distinto de otro. En este caso se aplica para la pendiente de las ecuaciones, que deben ser distintas a 0, ya que como se ha nombrado anteriormente, la pendiente muestra la sensibilidad del método (AEFI, 2001).

1.3. Precisión, exactitud y recuperación

La precisión es un parámetro que se utiliza para determinar el grado de dispersión que hay entre varias medidas de una misma muestra homogénea. El grado de dispersión se mide con el coeficiente de variación.

La exactitud, sin embargo, mide la proximidad que hay entre el valor nominal y el valor experimental. Este parámetro se suele evaluar con el error relativo.

Por último, es habitual realizar un estudio de recuperación para comprobar la especificidad y exactitud del método, ya que consiste en medir la eficacia de extraer y cuantificar un analito presente en la matriz de la muestra y que, además, ha sido añadido a esta en concentración conocida (AEFI, 2001).

1.4. Límites de detección y cuantificación

El límite de detección (LD) se define como la mínima cantidad de analito que puede detectar el método, discriminándolo del blanco. Y el límite de cuantificación (LC) indica la mínima cantidad de analito que se puede determinar cuantitativamente con precisión y exactitud (AEFI, 2001).

1.5. Estabilidad

Por último, el parámetro de estabilidad permite establecer el periodo de tiempo en el cual se mantienen las propiedades de los estándares utilizados, en este caso, la concentración de antioxidantes, dentro de unos límites determinados, y en unas condiciones concretas (AEFI,2001).

Una vez definidos todos los parámetros utilizados para la validación de los métodos, se analizan algunos artículos sobre validaciones de las metodologías espectrofotométricas utilizadas. Durante la búsqueda se vio como existen pocos trabajos de este tipo.

A pesar de que los métodos utilizados en este trabajo son muy comunes en los laboratorios de análisis de vinos y de caracterización de extractos naturales, existen pocos estudios en los que se habla de su validación. Algunos de ellos son:

El artículo de Rivero-Pérez et al. (2007) donde realizaron la validación de varios métodos, entre ellos ABTS, DPPH y FRAP, y compararon los resultados obtenidos. Obtuvieron coeficientes de variación superiores a 0,99 y una distribución aleatoria de los residuos. También, todos los valores de los coeficientes de variación eran inferiores al 5% y se obtuvo un buen ajuste entre los datos obtenidos experimentalmente y los calculados. Además, se calcularon los valores de t de Student, para la pendiente y ordenada en el origen, cumpliendo con los parámetros establecidos. La conclusión final es que se trata de métodos que es posible validarlos y cumplen con los criterios establecidos de linealidad, exactitud y precisión. Asimismo, el método ABTS permite realizar los análisis de rutina ya que tiene un coste bajo, es rápido y fácil de realizar.

El método de Folin-Ciocalteu fue validado por Espinosa Manrique et al. en 2016, para cuantificar los polifenoles totales en la especie *Vaccinium meridionale*. La validación del método les permitió demostrar que los resultados obtenidos eran fiables. Por último, Ortíz et al. (2016) realizaron la validación de técnicas espectrofotométricas para la determinación de flavonoides totales para poder realizar el control de productos farmacéuticos.

Por tanto, debido a la escasez de trabajos encontrados, resulta muy interesante la validación de estos métodos espectrofotométricos utilizados frecuentemente en la caracterización fenólica y la determinación de la capacidad antioxidante de extractos vegetales y diferentes matrices alimentarias.

2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es la validación de cinco métodos espectrofotométricos empleados en la caracterización de extractos vegetales y análisis de vinos. Para ello, se plantean varios objetivos secundarios:

- Conocimiento y optimización de los distintos métodos validados
- Conocer y comprender como se realizan las validaciones
- Utilización de los métodos validados para el análisis de muestras de vino reales.

3. Materiales y métodos

3.1. Muestras

Las muestras de vino analizadas se vinificaron en la Estación de Viticultura y Enología de Navarra (EVENA), en Olite. La uva utilizada para elaborar estos vinos fue de la variedad Tempranillo y los vinos se obtuvieron mediante un proceso de vinificación estándar. La uva se despalilló y estrujó antes de someterla a fermentación alcohólica en depósitos de acero inoxidable de 25 L. Tras esta primera fermentación, los vinos sufrieron la fermentación maloláctica y, a continuación, la estabilización tartárica en cámaras a 4 ^{o}C durante 30 días. Finalmente, los vinos fueron embotellados y envejecidos durante 2 años en botella en condiciones de bodega antes de su análisis. Estos vinos son fruto de una experiencia de colaboración con EVENA con el objetivo de buscar alternativas al anhídrido sulfuroso en la elaboración de vinos.

En este caso, se realizaron 8 tratamientos distintos: control negativo (sin ningún antioxidante); control positivo (con las dosis habituales de SO_2); tratamiento con adición de extracto de raspón de Mazuelo; tratamiento con adición de raspón de Mazuelo molido; tratamiento mixto de Mazuelo (con SO_2 y extracto de raspón de Mazuelo); tratamiento con adición de extracto de raspón de Tempranillo; tratamiento con adición de raspón de Tempranillo molido; tratamiento mixto de Tempranillo (con SO_2 y extracto de raspón de Tempranillo). Se realizaron 2 vinificaciones en depósitos distintos de cada uno de los tratamientos.

A continuación, en la Tabla 1 se muestran las diferentes cantidades de SO_2 y de extracto de raspón o raspón molido sin extraer, que se añadieron en cada uno de los casos.

Tabla 1. Diseño experimental de las muestras de vino

Tipo de muestra	Tratamiento	SO_2 (g/l)	Extracto/raspón (g/l)
Control	Positivo	0,06	0
	Negativo	0	0
Mazuelo	Extracto Mazuelo	0	0,2
	Mixto (Extracto + SO_2)	0,02	0,1
	Raspón Mazuelo	0	0,4
Tempranillo	Extracto Tempranillo	0	0,2
	Mixto (Extracto + SO_2)	0,02	0,1
	Raspón Tempranillo	0	0,31

Todas las muestras de vino fueron analizadas para determinar, por métodos espectrofotométricos, su capacidad antioxidante y su contenido en compuestos fenólicos totales, flavonoides y antocianinas. Para ello, se utilizaron métodos analíticos previamente validados, salvo en el caso de la determinación de antocianinas ya que se trata de un método estandarizado definido por la AOAC (Association of Official Analytical Chemists), que se realiza sin curva de calibrado, por lo que no es necesaria su validación. Para todos los análisis se utilizó un espectrofotómetro UV visible JENWAY modelo 7315 (Imagen 2).

Imagen 2. Espectrofotómetro UV visible JENWAY modelo 7315

3.2. Métodos de determinación de capacidad antioxidante

3.2.1. ABTS

El ensayo original fue diseñado por Miller y Rice-Evans en 1993, y posteriormente fue modificado por Re et al. en 1999.

Este método consiste en hacer reaccionar el ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) con persulfato de potasio, para formar un cromóforo azul/verdoso estable de $ABTS^{+}$ (Re et al., 1999). El cromóforo así obtenido, cambia de color cuando el radical se reduce en presencia de compuestos con capacidad antioxidante como los compuestos fenólicos. La pérdida de color desde un azul intenso a incoloro es directamente proporcional a la cantidad de antioxidantes presentes en las muestras (Imagen 4).

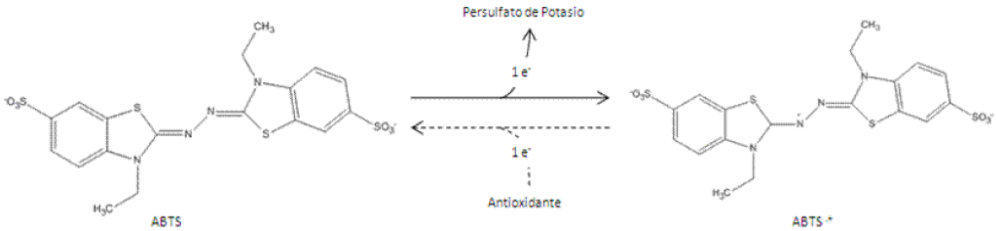

Imagen 3. Reacción de formación del radical ABTS (Mercado Sánchez, 2010)

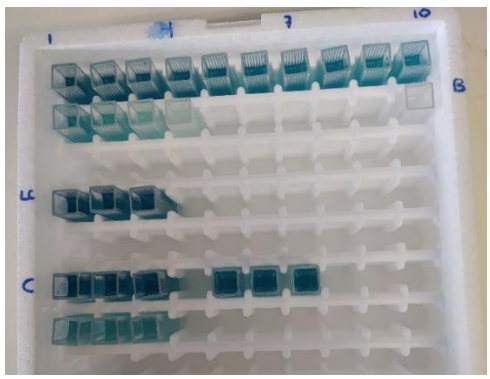

Imagen 4. Método ABTS

Para determinar la capacidad antioxidante por este método, en primer lugar, se preparó una disolución de ABTS 7 mM que se hizo reaccionar con persulfato de potasio 2,45 mM. Esta nueva disolución se dejó en oscuridad entre 12 y 16 horas. Pasado ese tiempo, la mezcla se diluyó con metanol hasta que su absorbancia a 734 nm fue 0,70±0,02.

A continuación, se prepararon los patrones y controles para la curva de calibrado. Para ello, se realizaron dos disoluciones madre de Trolox 5 mM, una para los estándares de calibración y otra para los estándares de control. A partir de ellas se realizaron las diluciones correspondientes para preparar los estándares de calibración, los de control y los estándares a la concentración del límite de cuantificación. Por otra parte, los vinos se diluyeron en metanol en una proporción 1:15 para su análisis.

Para la determinación de la capacidad antioxidante de las muestras, se añadieron 30 µl de estándar de Trolox o muestra de vino diluida y 2,97 ml de la disolución de ABTS. Tras 30 minutos en oscuridad, se midieron las absorbancias a 734 nm.

3.2.2. DPPH

Brand Williams, Cuvelier y Berset desarrollaron en 1995 el método DPPH para evaluar la actividad antioxidante de distintos compuestos fenólicos. Para ello, hicieron reaccionar los compuestos antioxidantes con el radical estable DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil) de color morado. Al reducirse el DPPH, disminuye su absorbancia pasando del color púrpura a un color amarillento (Imagen 6).

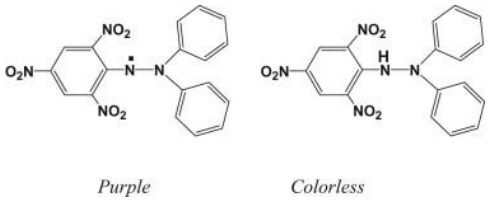

Imagen 5. Reacción de transferencia de electrones en el método DPPH (Schaich et al., 2015)

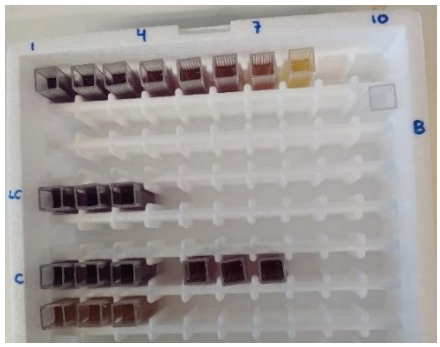

Imagen 6. Método DPPH

Para realizar este ensayo, se preparó una disolución 0,09 mM de DPPH, y posteriormente se diluyó con metanol hasta alcanzar una absorbancia de 0,90±0,05 a 517 nm. A continuación, se prepararon 2 disoluciones madre del antioxidante Trolox con una concentración 5 mM, una para los estándares de calibración y la otra para los estándares control. Posteriormente, se realizaron las diluciones correspondientes para preparar dichos estándares. Respecto a la dilución utilizada en los vinos para su análisis fue 1:16 con metanol.

Finalmente, se añadieron 150 µl de estándar de Trolox o de muestra de vino diluida, y 2,85 ml de DPPH. Se dejaron en oscuridad durante 30 minutos, y se midió su absorbancia a 517 nm.

3.2.3. FRAP

El ensayo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) fue desarrollado por Benzie y Strain en 1996, para medir el poder antioxidante del plasma. En este caso, el complejo Fe^3-TPTZ se reduce al reaccionar con los antioxidantes a pH ácido (3,6), adquiriendo un color azul oscuro. Así, pasa de una absorbancia baja, de un color naranja translucido, a un tono azul oscuro con absorbancias mayores (Imagen 8).

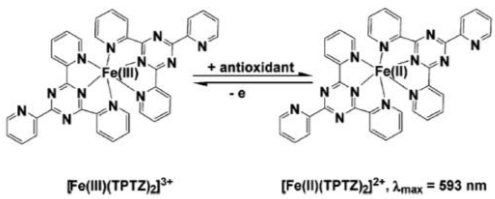

Imagen 7. Transferencia de electrones en FRAP (Huang et al., 2005)

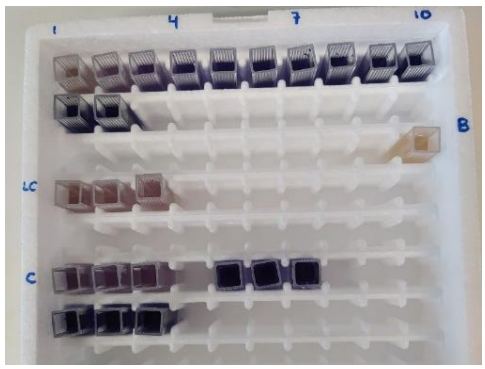

Imagen 8. Método de FRAP

En este ensayo se prepararon 4 disoluciones diferentes: tampón de acetato 300 mM, disolución HCl 40 mM, disolución 10 mM de TPTZ (2,4,6-tri (2-piridil)-s-triazina) y una disolución $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 20 mM. La disolución de TPTZ se preparó disolviendo 2,4,6-tri (2-piridil)-s-triazina en la disolución de HCl anterior. A continuación, se mezclaron las disoluciones de tampón acetato, TPTZ y $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ en la proporción 10:1:1.

Para la curva de calibrado, se realizaron 2 disoluciones madre de Trolox de 5 mM, una para los estándares de calibración y la otra para los estándares control. A partir de las disoluciones madre, se hicieron las diluciones correspondientes para preparar dichos estándares. La dilución que se usó en este caso para medir la capacidad antioxidante de los vinos analizados fue 1:25. Finalmente, se añadieron 150 µl de estándar de Trolox o muestra de vino diluida y 2,85 ml de FRAP en las cubetas espectrofotométricas, finalmente se mantuvieron en oscuridad durante 30 minutos, antes de medir la absorbancia a 595 nm.

3.2.4. Método de determinación del contenido fenólico total

Para determinar el contenido total de compuestos fenólicos en las muestras se utilizó el método desarrollado por Singleton, Orthofer y Lamuela-Raventós en 1999.

El reactivo utilizado es el Folin-Ciocalteu (FC), que contiene heteropolifosfonatos-molibdatos. El molibdeno se reduce al reaccionar con los compuestos fenólicos, dando lugar a un color azul (Huang et al., 2005). De esta forma, a concentraciones bajas de antioxidantes, el color azul es muy tenue (casi incoloro), pero a medida que aumenta la concentración de estos compuestos, se incrementa la absorbancia y el color azul se intensifica (Imagen 10).

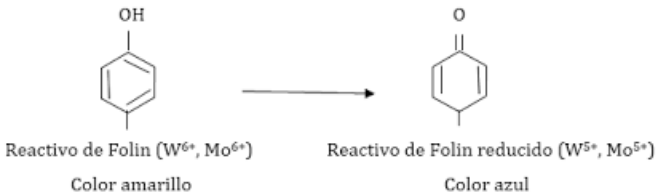

Imagen 9. Reducción del reactivo FC (Diez de la Iglesia, 2018)

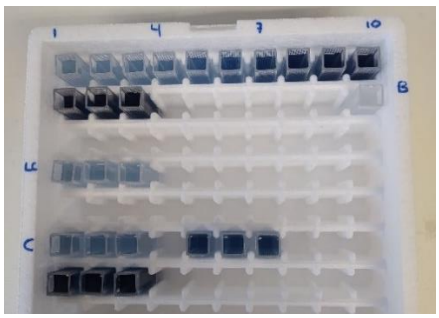

Imagen 10. Método Folin-Ciocalteu

En primer lugar, se prepararon dos disoluciones madre de ácido gálico 5 mM, una para los estándares de calibración y la otra para los estándares de control. Asimismo, se preparó una disolución de Na_2CO_3 al 20 % en agua. Por su parte, las muestras de vino se diluyeron con metanol en proporción 1:4. A continuación, se hicieron reaccionar 0,1 ml disolución estándar de ácido gálico o muestra de vino diluida, 7,9 ml de agua desionizada, 0,5 ml del reactivo FC y, transcurridos 2 minutos, se añadieron 1,5 ml de la disolución de Na_2CO_3. La mezcla final se dejó en oscuridad durante 2 horas y, a continuación, se midió su absorbancia a 765 nm.

3.2.5. Método de determinación del contenido de flavonoides

El método de $AlCl_3$, originalmente desarrollado por Woisky y Salatino (1998), se utiliza para determinar el contenido de flavonoides en distintos tipos de muestras. El $AlCl_3$ forma un complejo con un grupo cetona y un grupo hidroxilo de los antioxidantes (Chandra et al., 2014), dando así un color amarillo, que va aumentando conforme se incrementa la concentración de flavonoides (Imagen 12).

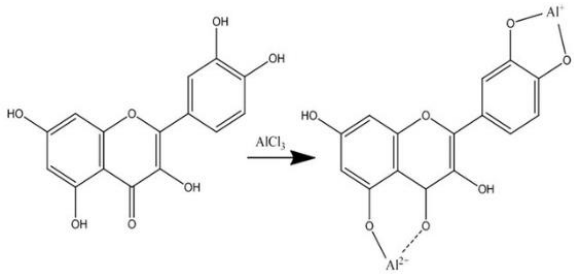

Imagen 11. Reacción de formación del complejo flavonoide-$AlCl_3$ (Makuasa & Ningsih, 2020)

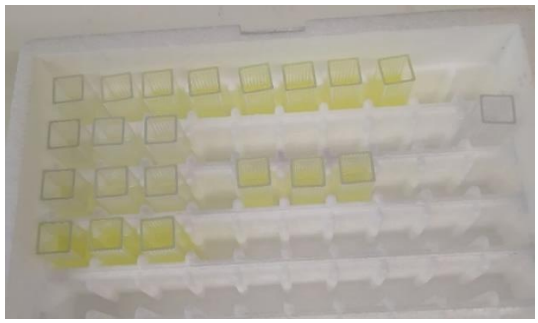

Imagen 12. Método $AlCl_3$

En este método se utilizó quercetina como estándar para la curva de calibrado. Para ello, se realizaron 2 disoluciones madre, una para los estándares de calibración y otra para los estándares de control. En primer lugar, con cada una de las disoluciones madres, se preparó una disolución de quercetina a 2000 ppm y, a partir de esta, se elaboró la disolución de trabajo a una concentración de 400 ppm. A partir de las madres de quercetina a 400 ppm, se hicieron las diluciones de los patrones, las muestras para determinar el límite de cuantificación y los controles. A continuación, se preparó una disolución de $AlCl_3$ al 2% en ácido acético 5%. Para las muestras de vino, se utilizó la dilución 1:7. Finalmente, se añadieron 1,5 ml de estándar de quercetina o muestra de vino diluida y 1,5 ml de la disolución de $AlCl_3$, se dejó en oscuridad durante 20 minutos, y se midió la absorbancia a 420 nm.

3.2.6. Antocianinas

Para determinar el contenido total de antocianinas en los vinos, se siguió el método del pH diferencial propuesto por la AOAC Official Method 2005.02, y descrito por Lee, Durst y Wrolstad en 2005. Este método se basa en la variación reversible del color de los pigmentos de las antocianinas al variar el pH, de 1 a 4,5 (AOAC, 2005) (Imagen 13).

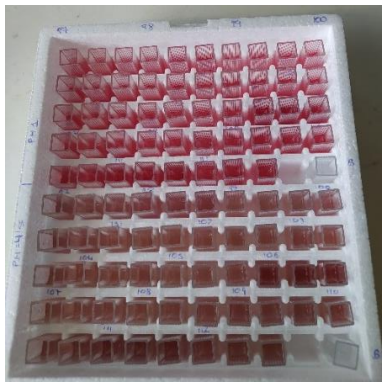

Imagen 13. Resultado muestras de vino con el método de las antocianinas

Para llevar a cabo el análisis, se prepararon dos disoluciones tampón de distinto pH. En primer lugar, se preparó una disolución tampón de cloruro de potasio 0,025 M (pH 1), y en segundo lugar, una disolución tampón de acetato de sodio 0,4 M (pH 4,5). A continuación, en las cubetas espectrofotométricas, se añadió la muestra de vino y la disolución tampón correspondiente en proporciones adecuadas para conseguir una dilución 1:20. Se dejaron las muestras en oscuridad entre 20 y 50 minutos, la lectura de la absorbancia se realizó a dos longitudes de onda: 520 nm y 700 nm. Se midieron todas las muestras de vino a los 2 pHs, y a las 2 longitudes de onda especificadas. Finalmente, para calcular la cantidad de pigmento de antocianinas se utilizó la siguiente fórmula (AOAC, 2005):

$$Pigmentos\ de\ antocianinas\ \left(\frac{mg}{l}\right) = \frac{\Delta * MW * Df * 10^3}{\varepsilon * 1} \qquad [1]$$

Siendo:

- $\Delta = (\Delta 520\ nm - \Delta 700\ nm)_{pH1} - (\Delta 520\ nm - \Delta 700\ nm)_{pH4,5}$
- MW: peso molecular malvidina (463,3 g/mol)
- Df: factor de dilución
- 1: espesor de la cubeta
- ε: coeficiente extinción malvidina= 28000 L/mol*cm
- 10^3: factor de conversión a mg

3.3. Procedimiento de validación

Se ha realizado la validación de cinco de los métodos espectrofotométricos utilizados: los tres métodos de determinación de capacidad antioxidante (ABTS, DPPH, FRAP), el método para cuantificar el contenido fenólico total (Folin-Ciocalteu) y el método de determinación del contenido total de flavonoides ($AlCl_3$). Todos estos métodos se utilizan habitualmente para la caracterización de extractos vegetales y de muestras de vino en el laboratorio de Química Analítica del Departamento de Ciencias de la UPNA. Para ello, se realizaron cada uno de los métodos en 3 días diferentes. Cada día de análisis, se prepararon todos los reactivos frescos, además de dos disoluciones madre: una para los estándares de calibrado y otra para los de control.

Los rangos de concentración utilizados para las rectas de calibrado de los diferentes métodos se encuentran recogidos en la Tabla 2. Según las guías de la FDA (Food and Drug Administration) y la guía ICH M10 (2019) de validación de métodos bioanalíticos, la concentración calculada de los estándares de calibrado a partir de la ecuación de la recta no debe desviarse más de un 15% del valor nominal (20% en el caso del estándar correspondiente al límite de cuantificación). Este criterio lo deben cumplir, al menos, el 75% de los estándares utilizados.

Cada uno de los tres días de validación, los estándares de control se prepararon a tres concentraciones diferentes (Tabla 2) y por triplicado:

- Q_{min}: Concentración en la zona inferior de la curva de calibrado
- Q_{med}: Concentración en la zona media de la curva de calibrado
- Q_{max}: Concentración entre el 75 y el 80 % del estándar de concentración más alta

Además, se prepararon también 3 réplicas del estándar correspondiente límite de cuantificación (LC), cuya concentración correspondió con la del estándar más bajo de la curva (Tabla 2).

Tabla 2. Rango de concentración, controles y límite de cuantificación

	Intervalo de concentraciones	**Q_{min}**	**Q_{med}**	**Q_{max}**	**LC**
ABTS (mM)	0,1 – 2,0	0,2	0,7	1,5	0,1
DPPH (mM)	0,10 – 0,65	0,15	0,30	0,50	0,10
FRAP (mM)	0,05 – 0,90	0,10	0,45	0,7	0,05
Folin-Ciocalteu (mM)	0,4 – 4,0	0,5	1,2	3,2	0,4
$AlCl_3$ (ppm)	3 – 30	5	15	23	3

Una vez obtenidas las 3 rectas de calibrado en días distintos, se calculó una recta de rectas (curva de validación) con todos los datos obtenidos. Para que la validación fuera fiable, fue necesario realizar varios tests para comprobar si se cumplían los criterios de especificidad, linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y cuantificación. Además, se determinó la estabilidad de los estándares utilizados. A continuación, se describen brevemente los tests aplicados a los resultados obtenidos para determinar si las validaciones cumplían con los criterios establecidos.

3.3.1. Evaluación de la especificidad

Los métodos analíticos a validar en el presente TFG miden la concentración total de un tipo de sustancias con propiedades comunes (antioxidantes, compuestos fenólicos o flavonoides) y, por lo tanto, no se trata de métodos específicos para un único compuesto. Por ello, la existencia o no de interferentes en la muestra que absorban a la longitud de onda específica de cada uno de los métodos utilizados, se determinó mediante ensayos de recuperación que se detallarán más adelante (Apartado 3.3.3 C).

3.3.2. Evaluación estadística de la linealidad

La linealidad de los diferentes métodos analíticos dentro de su rango de concentraciones se evaluó en tres días diferentes. Para ello, se realizó una recta de calibrado diaria, que relacionaba la concentración del antioxidante utilizado como estándar en cada caso, con la señal instrumental (absorbancia).

A continuación, se calculó la recta de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados, obteniendo la ecuación: $Y = bx + a$. Siendo b, la pendiente; a, el término independiente y X, la concentración del analito. Para calcular la pendiente y el término independiente se usaron las siguientes expresiones:

$$b = S_x / S_{xy} \quad [2]$$

$$a = \bar{Y} - (b \cdot \bar{X}) \quad [3]$$

Siendo:

- $\bar{Y}$: media de valores de la variable dependiente
- $\bar{X}$: media de valores de la variable independiente

Además, se calcularon el coeficiente de correlación (R) y el de determinación (R^2). El valor máximo del coeficiente de correlación es 1, por lo que cuanto más cercano esté a la unidad, mayor es la probabilidad de que exista correlación entre ambas variables. Según los criterios de validación de métodos analíticos de la AEFI, el valor recomendable para el coeficiente de correlación es ≥ 0,999. El cálculo del coeficiente de correlación se realizó mediante la fórmula que aparece a continuación (AEFI, 2001).

$$R = \frac{Sxy}{\sqrt{Sx \cdot Sy}} \quad [4]$$

Siendo:

- $S_{xy} = \Sigma(X_i * Y_i) - ((\Sigma X_i * \Sigma Y_i)/n_y)$
- $S_x = \Sigma X^2 - (\Sigma X^2 / n_y)$
- $S_y = \Sigma Y^2 - (\Sigma Y^2 / n_y)$
- n_y: número de datos de la señal

El coeficiente de determinación es el cuadrado del de correlación. Es necesario calcular este coeficiente de determinación (R^2) ya que aporta una mayor significación estadística (AEFI, 2001).

a. Varianza residual constante (homocedasticidad)

Para calcular si la varianza residual es constante o no, se representaron en un gráfico los valores residuales (e_i) frente a los valores estimados ($\hat{Y}_i$). Los valores residuales se calcularon aplicando la siguiente ecuación:

$$e_i = Y_i - \hat{Y}_i \quad [5]$$

$$\hat{Y} = (X_i - a) \cdot b \quad [6]$$

Siendo:

- e_i: diferencia entre el valor observado de la variable dependiente y el valor dado por la ecuación de la recta de regresión
- $\hat{Y}_i$: valores estimados de la variable dependiente a partir de la ecuación de la recta de regresión
- Y_i: valores de la variable dependiente por grupos de concentraciones
- X_i: valores de la variable independiente por grupos de concentraciones
- a: término independiente de la recta de regresión
- b: pendiente de la recta de regresión

Una distribución aleatoria de esos datos indica el cumplimiento de la condición de homocedasticidad (AEFI, 2001).

Además, a partir de estos valores se calculó la suma de cuadrados residual que se describe en el siguiente apartado.

$$SC_{res} = \Sigma e^2 \qquad [7]$$

b. Análisis de la Varianza: ANOVA

Antes de realizar el análisis de la varianza, se comprobó si los datos presentaban una distribución normal aplicando a los datos el test de normalidad de Shapiro Wilk. Asimismo, los datos debían cumplir la homogeneidad de varianzas y la normalidad de los residuales.

Para determinar si los datos presentaban homogeneidad de varianzas se realizó el test de Cochran con un nivel de confianza del 95%. Este test permite conocer si el factor concentración influye en la variabilidad de los resultados.

$$G_{calc} = S^2_{máxima} / \Sigma S^2_i \qquad G_{tab}\ (\alpha=0{,}05,\ K,\ n) \qquad [8]$$

Siendo:

- S^2_i: variancia de cada grupo K
- $S^2_{máxima}$: variancia máxima de los K grupos
- K: número de grupos
- n: número de datos

Para que se cumpla la homogeneidad de varianzas, G_{cal} debe ser inferior a G_{tab}. En caso contrario, al haber diferencias entre las varianzas, no se podría realizar el análisis ANOVA para evaluar la linealidad del método, ya que la concentración influiría en los resultados (AEFI, 2001).

Al igual que para comprobar la normalidad de los datos se aplicó el test de Shapiro Wilk para comprobar la normalidad de los residuales.

Cuando los datos cumplían todas estas condiciones se aplicó el ANOVA. Para realizar el análisis de la varianza, es necesario calcular F1 y F2 a partir de las diferentes sumas de cuadrados que se especifican en la Tabla 3. Estas sumas de cuadrados indican la medida de variación de los datos con respecto a la media (AEFI, 2001).

Tabla 3. Fórmulas para realizar el análisis de la variancia

	Suma de cuadrados (SC)	**Grados de libertad (gl)**	**Varianza (V)**	**F (α=0,05)**
Regresión	$SC_{reg}=\Sigma n_i(\hat{Y}_i-\bar{Y})^2$	1	$V_{reg}=SC_{reg}/gl_{reg}$	$F_1=V_{reg}/V_{res}$
Falta de ajuste	$SC_{fa}=\Sigma n_i(\bar{Y}-\hat{Y}_i)^2$	k-2	$V_{fa}=SC_{fa}/gl_{fa}$	
Error experimental	$SC_{exp}=\Sigma_i\Sigma_j\ (y_{ij}-\bar{Y}_i)^2$	n-k	$V_{exp}=SC_{exp}/gl_{exp}$	$F_2=V_{fa}/V_{exp}$
Residual	$SC_{res}=SC_{exp}+SC_{fa}$	n-2	$V_{res}=SC_{res}/gl_{res}$	
Total	$SC_t= SC_{reg}+ SC_{fa}+ SC_{exp}$ // $SC_t=\Sigma(Y_i-\bar{Y})^2$	n-1		

La suma de cuadrados residual se puede calcular de dos maneras: mediante la fórmula de los residuales que se ha expuesto en el anterior apartado, o como la suma de las SC de error experimental y falta de ajuste. Este valor indica la desviación que hay entre el valor experimental obtenido y el predicho por el modelo, debe ser lo más bajo posible para asegurar la fiabilidad de los resultados obtenidos (AEFI, 2001).

Respecto a los valores de F, F1 valora si la pendiente es distinta de 0, y F2 indica la linealidad de los resultados. Así, para cumplir el criterio de linealidad a partir del análisis de la varianza, $F1_{cal}$ debe ser superior a $F1_{tab}$. y $F2_{cal}$ tiene que ser inferior a $F2_{tab}$. Si ambos requisitos se cumplen, la pendiente es significativamente distinta de 0 y los resultados se ajustan a la linealidad del método (AEFI, 2001).

c. Otros tests de linealidad

La tercera forma de verificar la linealidad de los métodos ensayados se realizó mediante 2 procedimientos: la determinación de los coeficientes de variación de los factores de respuesta y la significación estadística de la desviación estándar de la pendiente.

Los <u>coeficientes de variación de los factores de respuesta (F)</u> sirven para determinar la sensibilidad del método, es decir, la capacidad para detectar bajas concentraciones de analito.

El factor de respuesta para cada punto de la recta de calibrado, se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$F=Y_i/X_i \qquad [9]$$

Siendo X_i y Y_i los valores de concentración y absorbancia de la ecuación de la recta de regresión (AEFI, 2001).

Una vez obtenidos todos los valores de los factores de respuesta, se calculó el coeficiente de variación (CV):

$$CV\ (\%)= S_f / \overline{F} * 100 \qquad [10]$$

Siendo S_f la desviación tipica de los factores de respuesta y $\overline{F}$ la media.

Los factores de respuesta deben ser similares entre sí, y cercanos al valor de la pendiente de la recta de calibrado. Cuanto menor sea el valor del coeficiente de variación, mayor será la linealidad del método. Los valores aceptados son los recomedados por la guía de la AEFI, siendo el máximo aceptado del 5% (AEFI, 2001).

Para determinar la <u>significación estadística de la desviación estándar de la pendiente</u> se utilizó la prueba de t de Student. Para ello, se calculó la t_{calc} tal y como se describe a continuación:

$$t_{calc}=|b|/S_b \qquad t_{tab}(gl=n-2,\ \alpha=0{,}05) \qquad [11]$$

Siendo:

- b: pendiente de la ecuación de la recta de regresión
- $S_b=\sqrt{(S_r^2/S_x)}$
- S_r (desviación estándar de la regresión) = $\sqrt{(S_y-b^2 * S_x)/(n_x-2)}$
- n_x: número de datos de la variable X

Cuando t_{cal} fue inferior a t_{tab}, la pendiente se consideró significativamente distinta a 0. Además, se calcularon los intervalos de confianza de dicha pendiente con la fórmula: $b \pm t_{tab}S_b$. Los intervalos así calculados no debían incluir el 0, ya que indican el intervalo de valores que puede presentar la pendiente (AEFI, 2001).

3.3.3. Precisión, exactitud y recuperación

a. Precisión

Para evaluar la precisión, se calculó la repetibilidad de los datos efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, en las mismas condiciones operativas (el mismo analista, mismo instrumento y mismos reactivos), en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto. Se determinó dicha variabilidad entre resultados obtenidos en días distintos (inter-día) y entre resultados obtenidos en el mismo día (intra-día) (AEFI, 2001).

La precisión se expresa mediante el coeficiente de variación:

$$CV\ (\%) = S/\bar{X} * 100 \qquad [12]$$

- S: desviación estándar de las concentraciones calculadas de los controles
- $\bar{X}$: media de las concentraciones calculadas de los controles

Cuanto menores fueron los valores del coeficiente de variación, mayor precisión presentó el ensayo, tanto intra-día como inter-día. A parte de los estándares planteados por la AEFI, también se consultó la guía ICH donde se permiten coeficientes de variación de hasta el 15 % (ICH, 2019).

b. Exactitud

Al igual que en la precisión, se realizó el análisis sobre la misma muestra, en las mismas condiciones operativas, en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto. En este caso, se evaluó la exactitud mediante el cálculo del error relativo (%), tanto inter-día como intra-día (AEFI, 2001).

$$Error\ relativo\ (\%) = \frac{(\bar{x}c - Ct)}{Ct} \times 100 \qquad [13]$$

Siendo:

- $\bar{X}_c$: promedio de la concentración calculada
- C_t: concentración nominal

Como con el CV, cuanto menor sea el valor del error relativo, más cercanos serán los resultados obtenidos por el método a los teóricos. En este estudio, el criterio de aceptación seguido para el error relativo fue el establecido por la guía ICH M10, el cual debe ser inferior al 15 % (ICH, 2019).

c. Estudio de recuperación

Para conocer la selectividad, precisión y exactitud de los métodos para el análisis en vinos, se realizó un estudio de recuperación. Así, se analizaron 3 muestras de vino sin adición estándar, y otras 3 muestras de vino con la adición de una concentración conocida de antioxidantes. Mediante la fórmula del porcentaje de recuperación, se calculó cuánto analito se había recuperado. Este valor debería ser igual o superior al 90 % (AEFI, 2001).

La fórmula para calcular la recuperación es (AEFI, 2001):

$$Recuperación\ (\%) = ((\bar{C}v - \bar{C}va) / Ca) * 100 \qquad [14]$$

- $\bar{C}_v$: media de la concentración del vino sin analito
- $\bar{C}_{va}$: media de la concentración del vino con analito
- C_a: concentración del analito adicionada

A partir de los valores de las repeticiones de la concentración de vino con analito se calculó, además, el coeficiente de desviación (AEFI, 2001):

$$CV\ (\%) = (Sc/\bar{C}_{va})*100 \qquad [15]$$

- Sc: desviación estándar de las concentraciones de vino con analito

3.3.4. Límites de detección y cuantificación

a. Límite de detección

Para calcular el límite de analito que se puede detectar, se ha utilizado la fórmula (AEFI, 2001):

$$LD = \frac{(3{,}3 \times Sr)}{b} \qquad [16]$$

- b: pendiente de la ecuación de la recta de regresión
- S_r (desviación estándar de la regresión) = $\sqrt{(S_y - b^2 * S_x)/(n_x - 2)}$

b. Límite de cuantificación

Se estableció como límite de cuantificación el valor de concentración del estándar más bajo de la curva de calibración. Se calcularon, además, el coeficiente de variación y el error relativo, al igual que en el apartado de precisión y exactitud. En este caso, se tomó como criterio de validación que ambos parámetros fueran inferiores al 15%, ya que al tratarse de las concentraciones más bajas el error asociado es mayor (AEFI, 2001).

3.3.5. Estabilidad

Para comprobar la estabilidad de los antioxidantes utilizados como estándares en los diferentes métodos, se usaron las mismas muestras de control Q_{min} y Q_{max} que se analizaron el día de su preparación y se conservaron en la nevera. Pasado un tiempo se volvieron a analizar para determinar si su nivel de concentración mantenía los criterios de exactitud y precisión obtenidos tras la validación del método. Mientras los controles cumplan con dicha exactitud, son estables y se pueden utilizar para realizar los análisis (AEFI, 2001).

4. Resultados y discusión

En este trabajo se analizaron muestras de vino obtenidas con diferentes tipos y cantidad de antioxidantes (con y sin SO_2, con extractos de raspón, con raspón molido, o con combinaciones de ellos), con objeto de conocer la influencia de dichos antioxidantes en el contenido fenólico de los vinos y su capacidad antioxidante global. La caracterización fenólica de las muestras se realizó empleando diferentes métodos espectrofotométricos (ABTS, DPPH, FRAP, Contenido Fenólico Total – Folin Ciocalteu, Contenido total en flavonoides – $AlCl_3$ y antocianinas totales). De forma previa a la realización del análisis de las muestras se realizó una validación de los métodos analíticos para garantizar una exactitud y precisión en los resultados que permitiera obtener resultados fiables y concluyentes. Así, fue necesario realizar una validación quíntuple.

A continuación, se describen los parámetros de validación determinados en cada método:

4.1. Validación de los métodos analíticos

4.1.1. Especificidad

El objeto de este análisis fue demostrar que los métodos empleados permiten medir de forma exacta e inequívoca el analito de interés. En este caso, se trata de métodos analíticos que miden un tipo de sustancias con características comunes (antioxidantes, compuestos fenólicos o flavonoides) y su concentración se expresa en función de un tipo de compuesto de referencia. Por tanto, no se trata de métodos específicos para un único compuesto. Además, pueden existir en la muestra compuestos que absorban a la longitud de onda seleccionada y no pertenezcan al grupo de sustancias a analizar. Eso dificulta la determinación de este parámetro con la simple observación de los espectros de absorción de los compuestos coloreados formados en cada caso. Por ese motivo, la existencia o no de interferentes en la muestra, diferentes de los compuestos a analizar y que absorban a la longitud de onda de análisis dando lugar a errores significativos en exactitud, se determinó mediante ensayos de recuperación que se mostrarán más adelante.

4.1.2. Linealidad

Se evaluó la linealidad de los diferentes métodos analíticos dentro de su rango de concentraciones en tres días diferentes. Los resultados de las determinaciones en cada uno de los tres días de análisis, junto con la recta de regresión obtenida a partir de esos valores por el método de ajuste de mínimos cuadrados se muestran las siguientes Tablas.

Para los métodos ABTS, DPPH y FRAP se utilizó Trolox en los rangos de concentración que aparecen en las Tablas 4, 5 y 6 respectivamente. Para el método de Folin-Ciocalteu, se usó ácido gálico (Tabla 7) y para el método de $AlCl_3$, quercetina (Tabla 8).

Tabla 4. Resultados de calibración del método ABTS en el rango de concentraciones de 0,1 a 2 mM de Trolox

DÍA 1		DÍA 2		DÍA 3	
Concentración Trolox (mM)	Señal	Concentración Trolox (mM)	Señal	Concentración Trolox (mM)	Señal
0,10	0,675	0,10	0,673	0,10	0,674
0,20	0,643	0,19	0,644	0,20	0,644
0,35	0,595	0,34	0,596	0,34	0,592
0,40	0,576	0,39	0,577	0,39	0,584
0,50	0,553	0,48	0,552	0,49	0,543
0,65	0,500	0,63	0,495	0,64	0,494
0,70	0,473	0,68	0,466	0,69	0,468
0,80	0,452	0,77	0,452	0,78	0,434
0,95	0,378	0,92	0,397	0,93	0,391
1,00	0,360	0,97	0,368	0,98	0,363
1,20	0,318	1,16	0,328	1,18	0,310
1,50	0,227	1,45	0,233	1,47	0,239
1,80	0,110	1,74	0,126	1,76	0,111
2,00	0,044	1,93	0,060	1,96	0,029

Recta de calibrado	***Pendiente*** $(b \pm t \cdot S_b)$ ***-0,3348 ± 0,0047***	***Término independiente*** $(a \pm t \cdot S_a)$ ***0,7078 ± 0,0046***	***Coeficiente de determinación*** (R^2) ***0,9974***	***Suma de cuadrados de los residuos (RSC) 0,005***

Tabla 5. Resultados de calibración del método DPPH en el rango de concentraciones de 0,1 a 0,65 mM de Trolox

DÍA 1		DÍA 2		DÍA 3	
Concentración Trolox (mM)	Señal	Concentración Trolox (mM)	Señal	Concentración Trolox (mM)	Señal
0,10	0,750	0,10	0,735	0,10	0,752
0,19	0,633	0,20	0,617	0,19	0,632
0,29	0,518	0,30	0,478	0,29	0,504
0,34	0,449	0,35	0,422	0,34	0,429
0,39	0,388	0,40	0,351	0,38	0,368
0,48	0,264	0,50	0,219	0,48	0,219
0,63	0,088	0,65	0,085	0,62	0,081

Recta de calibrado	***Pendiente*** $(b \pm t \cdot S_b)$ ***-1,257 ± 0,036***	***Término independiente*** $(a \pm t \cdot S_a)$ ***0,866 ± 0,014***	***Coeficiente de determinación*** (R^2) ***0,9947***	***Suma de cuadrados de los residuos (RSC) 0,022***

Tabla 6. Resultados de calibración del método FRAP en el rango de concentraciones de 0,05 a 0,9 mM de Trolox

DÍA 1		**DÍA 2**		**DÍA 3**	
Concentración Trolox (mM)	Señal	Concentración Trolox (mM)	Señal	Concentración Trolox (mM)	Señal
0,00	0,000	0,00	0,000	0,00	0,000
0,05	0,109	0,05	0,097	0,05	0,105
0,10	0,222	0,10	0,222	0,09	0,213
0,19	0,446	0,19	0,462	0,19	0,443
0,34	0,780	0,34	0,819	0,33	0,781
0,39	0,986	0,39	0,930	0,38	0,902
0,44	1,032	0,44	1,087	0,43	1,051
0,48	1,160	0,49	1,165	0,47	1,160
0,53	1,264	0,53	1,322	0,52	1,318
0,63	1,567	0,63	1,529	0,62	1,536
0,68	1,710	0,68	1,674	0,66	1,677
0,77	1,900	0,78	1,932	0,76	1,939
0,87	2,169	0,87	2,209	0,85	2,100

Recta de calibrado	***Pendiente*** $(b \pm t \cdot S_b)$	***Término independiente*** $(a \pm t \cdot S_a)$	***Coeficiente de determinación*** (R^2)	***Suma de cuadrados de los residuos (RSC)***
	2,514 ± 0,025	***- 0,025 ± 0,013***	***0,9986***	***0,023***

Tabla 7. Resultados de calibración del método Folin-Ciocalteu en el rango de concentraciones de 0,4 a 4 mM de ácido gálico

DÍA 1		DÍA 2		DÍA 3	
Concentración Trolox (mM)	Señal	Concentración Trolox (mM)	Señal	Concentración Trolox (mM)	Señal
0,00	0,000	0,00	0,000	0,00	0,000
0,41	0,106	0,40	0,100	0,41	0,086
0,51	0,125	0,49	0,120	0,51	0,121
0,61	0,157	0,59	0,155	0,61	0,142
0,82	0,204	0,79	0,196	0,82	0,191
1,02	0,240	0,99	0,252	1,02	0,233
1,22	0,300	1,19	0,313	1,23	0,283
1,63	0,401	1,58	0,377	1,64	0,374
2,04	0,477	1,98	0,471	2,05	0,476
2,45	0,566	2,38	0,562	2,46	0,551
3,26	0,749	3,17	0,731	3,28	0,700
3,47	0,782	3,37	0,778	3,48	0,774
3,87	0,866	3,76	0,854	3,89	0,873
4,08	0,918	3,96	0,882	4,10	0,910

Recta de calibrado	***Pendiente*** ***($b \pm t \cdot S_b$)*** ***0,2217 ± 0,0027***	***Término independiente*** ***($a \pm t \cdot S_a$)*** ***0,0155 ± 0,0061***	***Coeficiente de determinación*** ***(R^2)*** ***0,9978***	***Suma de cuadrados de los residuos*** ***(RSC)*** ***0,008***

Tabla 8. Resultados de calibración del método $AlCl_3$ en el rango de concentraciones de 3 a 30 ppm de quercetina

DÍA 1		DÍA 2		DÍA 3	
Concentración Trolox (mM)	Señal	Concentración Trolox (mM)	Señal	Concentración Trolox (mM)	Señal
0,00	0,000	0,00	0,000	0,00	0,000
2,91	0,134	2,82	0,134	2,59	0,118
4,85	0,225	4,69	0,196	4,31	0,200
9,71	0,453	9,39	0,431	8,63	0,399
14,56	0,683	14,08	0,661	12,94	0,605
19,42	0,891	18,77	0,855	17,25	0,813
22,33	1,026	21,59	1,012	19,84	0,942
24,27	1,120	23,47	1,113	21,57	1,024
29,13	1,365	28,16	1,359	25,88	1,233

Recta de calibrado	***Pendiente*** ***($b \pm t \cdot S_b$)*** ***0,0473 ± 0,0005***	***Término independiente*** ***($a \pm t \cdot S_a$)*** ***-0,0062 ± 0,0078***	***Coeficiente de determinación*** ***(R^2)*** ***0,9991***	***Suma de cuadrados de los residuos*** ***(RSC)*** ***0,005***

Según se especifica en la guía de Validación de métodos Analíticos de la AEFI, el valor recomendable para el coeficiente de correlación lineal (R) debe ser ≥ 0,999, lo cual indica que existe correlación entre la variable concentración y la variable señal. Además, para obtener una mayor significación estadística fue necesario calcular el valor del coeficiente de determinación, que muestra la proporción de la variación total de Y que es explicada por la variable X (AEFI, 2001). El valor de R^2 más elevado lo encontramos en el método de $AlCl_3$ (Tabla 8). Así, el 99,91% de la variabilidad de la señal se puede explicar por su dependencia lineal con las concentraciones de quercetina. Mientras que el valor más bajo, se encontró en el método DPPH (Tabla 5), siendo este de 0,9947. En este caso, el 99,47% de la variabilidad de la absorbancia se justifica por su dependencia lineal con las concentraciones de Trolox. La diferencia entre ambos valores, indica que en el método de DPPH existió un porcentaje mayor de variabilidad por causas ajenas a la concentración.

También se calculó la desviación de los estándares estimada a partir de la ecuación de la recta, donde los errores fueron todos inferiores al 15%. En ABTS y DPPH, el máximo error fue de un 7%, en FRAP del 2%. Mientras que en el método de Folin-Ciocalteu hubo solo un valor que se salió del criterio establecido, y el siguiente valor más elevado fue del 13%, el resto estuvieron por debajo del 10%. En el método de $AlCl_3$, el máximo valor fue de un 13% estando el resto de valores por debajo del 10%. Así, todos los métodos cumplen con el criterio establecido, y se comprueba la bondad de ajuste de los métodos.

Según un estudio llevado a cabo por Schaich et al. (2015), donde se evaluó el ensayo de DPPH, se encontraron varios factores que pueden modificar la respuesta obtenida en el ensayo. El que más nos interesa en este caso, es la gran influencia que tiene el medio en el ensayo. Las reacciones de DPPH son muy sensibles al entorno de la reacción, el disolvente utilizado puede variar las reacciones del antioxidante con el DPPH, por ejemplo, en el procedimiento seguido para realizar la validación se utilizó metanol como disolvente, este se une con los átomos de hidrógeno, inhibiendo así los procesos de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) de manera que solo se produce la transferencia de electrones (SET). Por otro lado, si el pH del medio es ácido, favorece los mecanismos SET, mientras que HAT no depende del pH. Finalmente, el oxígeno disuelto también interfiere, reaccionando escasamente con el DPPH, obteniendo una reactividad antioxidante anormalmente baja, ya que se oxidan los fenoles.

A través de este estudio, se puede explicar el mayor porcentaje de variabilidad que se obtiene en el ensayo de DPPH, en comparación con el resto de métodos analizados.

Más adelante, en los siguientes apartados se describen varios tests, donde se continúa con la evaluación de la linealidad, ya que el cálculo del coeficiente de correlación y el de determinación, no son suficientes para establecer la calidad del ajuste de la curva (Sanchez, 2017).

Respecto al valor de la pendiente y del término independiente, la pendiente está relacionada con la sensibilidad del método, de forma que cuanto mayor sea la pendiente, mayor sensibilidad tendrá el método. Y el término independiente indica el error sistemático, por lo tanto, cuanto menor sea el valor, menor será el error (AEFI, 2001).

Antes de analizar los valores obtenidos para la pendiente y el término independiente, es importante señalar que los métodos ABTS y DPPH presentaron pendiente negativa, ya que conforme aumenta la capacidad antioxidante disminuye la absorbancia, sin que ello signifique una baja sensibilidad. Por ello, el término independiente en ambos casos fue elevado, lo cual no significa que tengan un error sistemático elevado.

Analizando los resultados en el resto de métodos, se observó que el mayor valor de la pendiente se obtuvo en el método FRAP (Tabla 6), siendo de 2,514 ± 0,025. En cambio, el menor valor se encontró en el método $AlCl_3$ (Tabla 8), siendo de 0,0473 ± 0,0005. Así, el método FRAP fue el más sensible, mientras que el método del $AlCl_3$ fue el menos sensible. En lo que respecta al error sistemático, el método del $AlCl_3$ presentó el menor valor del término independiente (-0,0062 ± 0,0078), y el mayor correspondió al método de Folin-Ciocalteu, con un valor de 0,0155 ± 0,0061 (Tabla 7). Con este análisis se concluye que FRAP es el método con mayor sensibilidad, es decir, que es capaz de detectar menores concentraciones de analito que, por ejemplo, el método del $AlCl_3$. Por el contrario, es el método del $AlCl_3$, el que tiene un menor error sistemático, lo que

significa que se cometieron menos errores a la hora de efectuarlo (tanto a nivel instrumental, como del método y del analista), obteniendo un valor mayor en el método de Folin-Ciocalteu.

Por otra parte, se analizó la suma de cuadrados de los residuos. Si tiene un valor bajo, es un indicio de que los valores experimentales se desvían poco de lo que predice el modelo lineal. En todos los métodos se encontraron valores bajos de la suma de cuadrados de los residuos, los cuales estuvieron dentro del intervalo [0,005 – 0,023]. El valor más bajo (0,005) se encontró en los métodos ABTS (Tabla 4) y $AlCl_3$, mientras que el valor más elevado (0,023) fue el del método FRAP. Así, en el método FRAP los valores experimentales se desviaron algo más de los estimados que en ABTS y $AlCl_3$, pero es necesario recalcar que todos los valores obtenidos fueron bajos, desviándose poco los valores experimentales de los predichos.

Estos resultados nos muestran que el método $AlCl_3$ posee una mayor linealidad, y los valores experimentales obtenidos mediante este método son más fieles a los teóricos.

A continuación, se muestra la representación gráfica de los valores experimentales junto con la recta de regresión de cada uno de los métodos validados, lo que permite visualizar la bondad del ajuste de los cinco métodos.

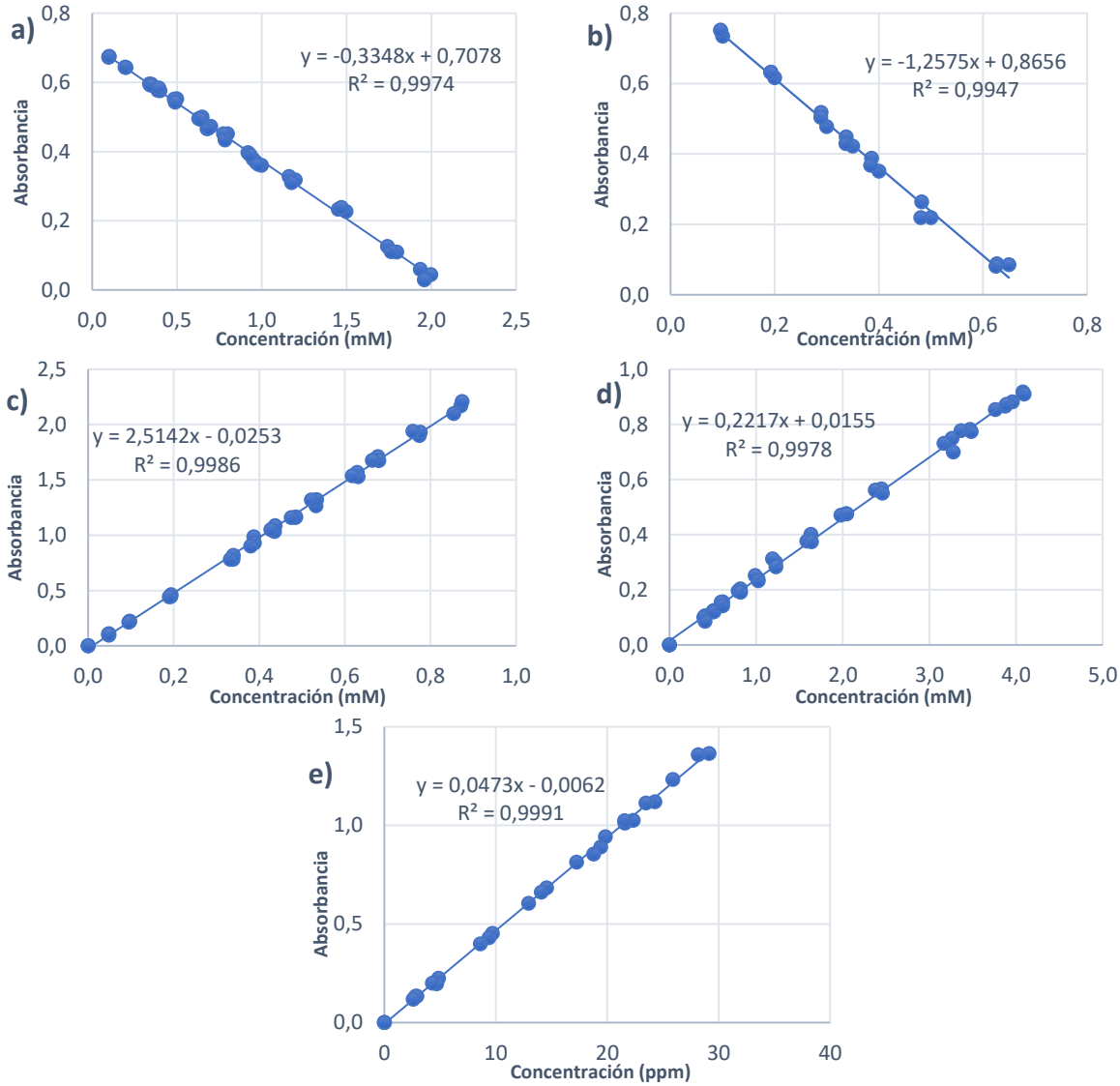

Figura 1. Relación entre la absorbancia y concentración de Trolox en ABTS (a), DPPH (b) y FRAP (c); Relación entre la concentración de ácido gálico en Folin-Ciocalteu (d) y concentración de quercetina en $AlCl_3$ (e)

En la representación gráfica de las rectas de calibrado, se aprecia de manera visual la pendiente negativa de los métodos ABTS y DPPH (Figura 1 a y b), como se ha explicado anteriormente.

Además de esta representación gráfica, se realizaron diferentes comprobaciones estadísticas de la linealidad. Los resultados obtenidos en cada caso se muestran a continuación:

a. Varianza residual constante (homocedasticidad)

Para comprobar si la dispersión de los datos obtenidos es constante se representaron los valores de los residuales (e), frente a los valores de Y estimados (Ŷ) a partir de la recta de calibrado. La siguiente Figura muestran los resultados obtenidos:

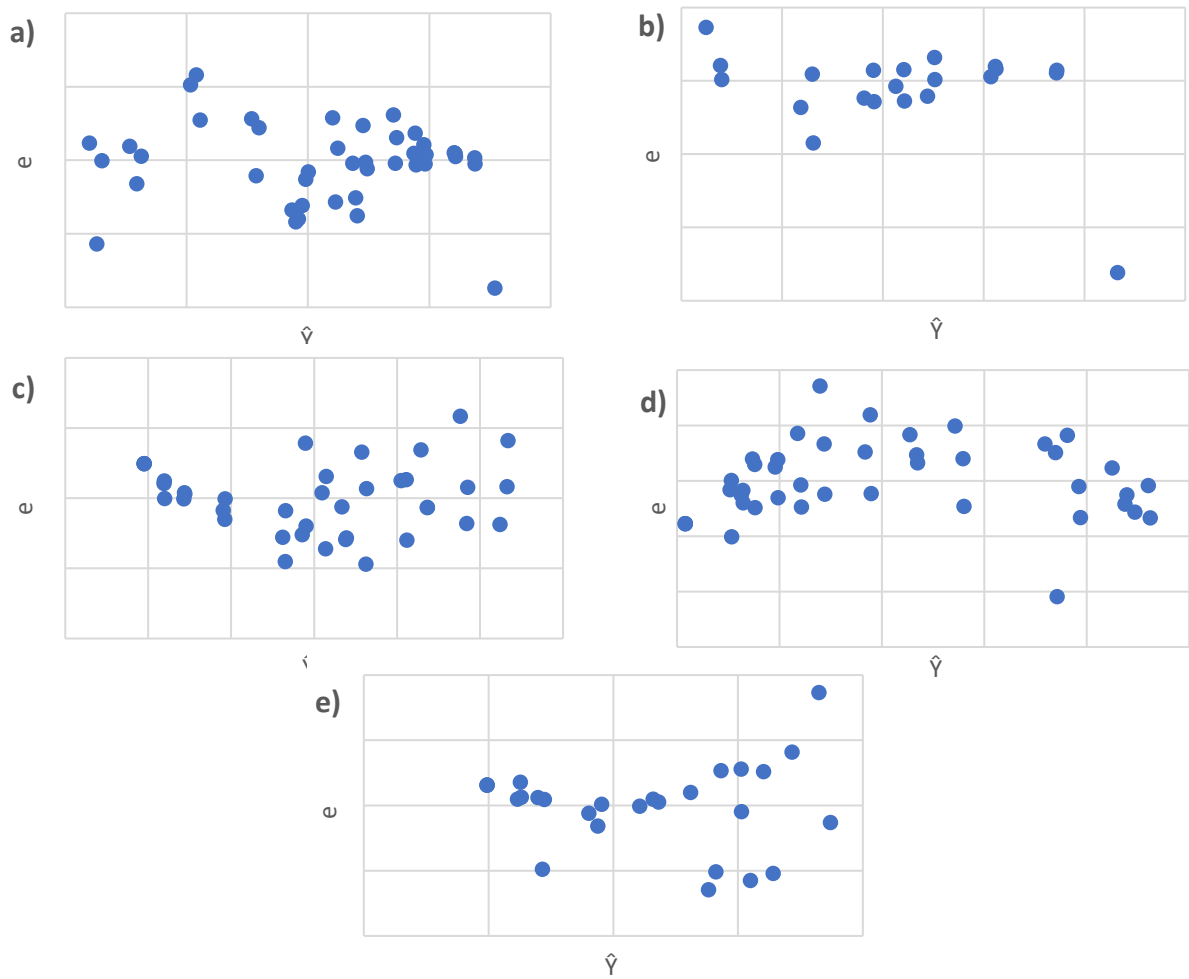

Figura 2. Gráficos de homocedasticidad con los métodos ABTS (a), DPPH (b), FRAP (c), Folin-Ciocalteu (d) y $AlCl_3$ (e)

Tal y como se puede comprobar, los datos siguieron en todos los casos una distribución aleatoria. No se observó ninguna tendencia, ya que la anchura de la nube de puntos en torno a la recta de regresión fue constante a lo largo de esta. Todo ello confirma que los modelos lineales empleados son adecuados.

b. Análisis de la Variancia (ANOVA)

Teniendo en cuenta que para poder llevar a cabo un ANOVA es necesario que exista homogeneidad de las varianzas y que los residuales sigan una distribución normal, se realizó previamente el test de Cochran para demostrar la homogeneidad de varianzas y un test de normalidad en todos los métodos. Todos los análisis se han realizado para un nivel de confianza del 95%. A continuación, se muestran los tests estadísticos para el análisis de la varianza:

Tabla 9. Tests estadísticos para el análisis de la varianza de ABTS

Homogeneidad de varianza (test Cochran)		Test de Normalidad (Saphiro Wilk)	
G_{tab}	0,445	Estadístico	0,958
G_{cal}	0,621	gl	42
Comparativa	$G_{cal} > G_{tab}$	Sig.	0,129
Conclusión	**Varianzas no homogéneas**	Conclusión	**Distribución normal de residuales**

Tabla 10. Tests estadísticos para el análisis de la varianza de DPPH

Homogeneidad de varianza (test Cochran)		Test de Normalidad (Saphiro Wilk)	
G_{tab}	0,561	Estadístico	0,665
G_{cal}	0,656	gl	21
Comparativa	$G_{cal} > G_{tab}$	Sig.	0,000
Conclusión	**Varianzas no homogéneas**	Conclusión	**Distribución no normal de residuales**

Tabla 11. Tests estadísticos para el análisis de la varianza de FRAP

Homogeneidad de varianza (test Cochran)		Test de Normalidad (Saphiro Wilk)		Análisis de la Varianza			
G_{tab}	0,445	Estadístico	0,987	$F1_{cal}$	28175,6	$F1_{tab}$	4,085
G_{cal}	0,375	gl	39	$F2_{cal}$	1,913	$F2_{tab}$	2,181
Comparativa	$G_{cal} < G_{tab}$	Sig.	0,923	Comparativa	$F1_{cal} > F1_{tab}$; $F2_{cal} < F2_{tab}$		
Conclusión	**Varianzas homogéneas**	Conclusión	**Distribución normal de residuales**	Conclusión	**Pendiente distinta de 0** **Linealidad de resultados**		

Tabla 12. Tests estadísticos para el análisis de la varianza de Folin-Ciocalteu

Homogeneidad de varianza (test Cochran)		Test de Normalidad (Saphiro Wilk)		Análisis de la Varianza			
G_{tab}	0,445	Estadístico	0,974	$F1_{cal}$	18517,129	$F1_{tab}$	4,085
G_{cal}	0,404	gl	42	$F2_{cal}$	2,249	$F2_{tab}$	2,118
Comparativa	$G_{cal} < G_{tab}$	Sig.	0,460	Comparativa	$F1_{cal} > F1_{tab}$; $F2_{cal} > F2_{tab}$		
Conclusión	**Varianzas homogéneas**	Conclusión	**Distribución normal de residuales**	Conclusión	**Pendiente distinta de 0 No linealidad de resultados**		

Tabla 13. Tests estadísticos para el análisis de la varianza de $AlCl_3$

Homogeneidad de varianza (test Cochran)		Test de Normalidad (Saphiro Wilk)	
G_{tab}	0,477	Estadístico	0,917
G_{cal}	0,661	gl	27
Comparativa	$G_{cal} > G_{tab}$	Sig.	0,033
Conclusión	**Varianzas no homogéneas**	Conclusión	**Distribución no normal de residuales**

En los métodos DPPH (Tabla 10) y $AlCl_3$ (Tabla 13) no se cumple el test de normalidad de Saphiro Wilk, por lo que el análisis de varianza no sirve para analizar la linealidad. Esto no significa que no se cumpla la linealidad en los métodos, sino que no se puede evaluar mediante el análisis de varianza. A través del coeficiente de determinación se ha comprobado que el ensayo DPPH si cumple con la linealidad (0,9947), y el $AlCl_3$ también (0,9991). Además, por el coeficiente de variación, el método $AlCl_3$ cumple con la linealidad (2,7%).

Respecto a la homogeneidad de varianzas, solo el ensayo de Folin-Cioclateu (Tabla 12) y FRAP (Tabla 11) cumplen con este requisito para realizar el ANOVA. Como se ha explicado anteriormente, esto no significa que los métodos ABTS (Tabla 9), DPPH y $AlCl_3$ no sean lineales. En ABTS, su coeficiente de correlación (0,9974) justifica su linealidad, además de la suma de cuadrados donde junto con $AlCl_3$, son los métodos con menor desviación de los resultados obtenidos de los calculados por la ecuación de la recta.

Mientras que en los ensayos de FRAP y Folin-Ciocalteu, donde sí se ha podido realizar el ANOVA, los resultados obtenidos han sido que la pendiente es significativamente distinta a 0 en ambos casos, pero los resultados sugieren que no se cumple la linealidad en Folin-Ciocalteu, mientras que en FRAP sí. La linealidad de Folin-Ciocalteu se puede demostrar mediante el coeficiente de determinación siendo este de 0,9978 y de la suma de cuadrados de los residuales, donde su valor (0,008) es el segundo más bajo detrás de ABTS y $AlCl_3$, lo cual expresa que la desviación de los valores experimentales se desvía poco de los predichos por el método, confirmando así su linealidad. Así, se podría decir que el método de ABTS, aunque cumple linealidad, es el menos lineal de los métodos validados.

En el siguiente apartado se realizan dos pruebas más donde se comprueba la linealidad de los métodos.

c. Test de linealidad

La verificación de la linealidad se llevó a cabo mediante dos procedimientos diferentes. El primero de ellos consistió en determinar el coeficiente de variación de los factores de respuesta (F).

En todos los métodos, excepto en ABTS y DPPH los valores de F fueron semejantes entre sí y cercanos a la pendiente, y se pudo evaluar el CV (%).

En el caso de ABTS y DPPH, no se pudo realizar este test, ya que sus rectas tienen pendientes negativas, de forma que al aumentar la concentración de Trolox disminuye la absorbancia del radical empleado. Esto provoca que los valores de F no sean similares entre sí ni con la pendiente, y que tengan coeficientes de variación muy elevados. Con el resto de métodos sí se evaluó la linealidad con este test, y los resultados se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Coeficientes de variación (%) de los factores de respuesta de los distintos métodos

	FRAP	Folin-Ciocalteu	$AlCl_3$
CV (%)	4,7	5,5	2,7

La AEFI recomienda valores inferiores al 2%, siendo los superiores al 5% indicativos de falta de linealidad. De los resultados obtenidos, el coeficiente de variación menor fue del 2,7% en el método de $AlCl_3$, teniendo el resto valores cercanos al 5%. Siguiendo estas indicaciones, el método de Folin-Ciocalteu podría tener falta de linealidad. Sin embargo, teniendo en cuenta que el coeficiente de variación no es el único procedimiento para evaluar la linealidad, se podría seguir confiando en los resultados obtenidos, ya que, por ejemplo, el valor de la suma de cuadrados de los residuos en este caso es de los más bajos, siendo de 0,008 (Tabla 7). Además, el valor de CV de los factores de respuesta obtenido para este método se encuentra muy próximo a 5%, por lo que en conjunto global se puede dar por aceptado el criterio de linealidad.

El segundo método de verificación de la linealidad consistió en determinar la significación estadística de la desviación estándar de la pendiente (S_b), obtenida a partir del cálculo de la varianza residual $S^2_{y,x}$. Con el valor de la pendiente y de S_b, se determinó el valor de t experimental, y se comparó con el valor de t de Student tabulado. Los datos obtenidos para cada método quedan reflejados en la Tabla 15:

Tabla 15. Resultados de la determinación de la significación estadística de la desviación estándar de la pendiente

	ABTS	DPPH	FRAP	Folin-Ciocalteu	$AlCl_3$
t_{cal}	-122,89	-59,58	167,86	136,08	169,90
t_{tab}	1,68	1,73	1,69	1,68	1,71
Resultados	$t_{cal} < t_{tab}$	$t_{cal} < t_{tab}$	$t_{cal} > t_{tab}$	$t_{cal} > t_{tab}$	$t_{cal} > t_{tab}$
Intervalo	[-0,34 – -0,33]	[-1,29 – -1,22]	[2,49 – 2,54]	[0,22 – 0,22]	[0,05 – 0,05]

*t_{tab} (gl=n-2 ; α=0,05)

Para que los métodos evaluados cumplan con este test, deben tener la pendiente significativamente distinta a 0, por lo que se debe cumplir que $t_{cal} > t_{tab}$, y que el intervalo de confianza no incluya el 0.

En el caso del ABTS y DPPH, no se cumplió que $t_{cal} > t_{tab}$, ya que, como se ha explicado anteriormente, su pendiente fue negativa, de forma que la t_{cal} tuvo también un valor negativo. Por este motivo, lo que se comparó fue el valor absoluto de t_{cal}. En ese caso sí se cumplió el criterio, pudiéndose comprobar, además,

que el intervalo de confianza no incluyó el 0, lo que confirma que ambos métodos cumplen con que la pendiente es significativamente distinta de 0.

El resto de métodos cumplieron con la condición de $t_{cal} > t_{tab}$, y, además, sus intervalos tampoco incluyeron el 0. Por lo tanto, a la vista de los resultados se puede confirmar que todos los métodos presentan una pendiente significativamente distinta a 0, por lo que se cumple con la condición de linealidad.

4.1.3. Precisión y exactitud

Para conocer la variabilidad del método de análisis (precisión), se estudió el grado de concordancia entre una serie de medidas de muestras control realizadas en todo el rango de calibración lineal. Por otra parte, la proximidad entre un valor de concentración obtenido mediante este método de análisis y el valor de concentración real (exactitud), se determinó mediante el análisis de muestras de concentración exacta y conocida, dentro del rango lineal de calibración.

Las siguientes Tablas muestran los resultados obtenidos para la evaluación de repetibilidad y exactitud de cada uno de los tres días de análisis (intra-día).

Tabla 16. Resultados de repetibilidad y exactitud intra-día, obtenidos en cada día de validación en ABTS

	Concentración real (mM)	Concentración calculada promedio (mM)	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (%)	Error relativo (%)
DÍA 1	0,20	0,21	0,00	0,8	4,9
	0,69	0,69	0,01	1,3	-0,7
	1,48	1,46	0,04	2,6	-1,7
DÍA 2	0,19	0,20	0,01	4,6	2,3
	0,68	0,69	0,02	2,4	1,1
	1,46	1,45	0,03	2,1	-0,1
DÍA 3	0,20	0,20	0,01	6,1	0,2
	0,69	0,71	0,03	3,8	2,6
	1,48	1,54	0,02	1,4	4,2

Tabla 17. Resultados de repetibilidad y exactitud intra-día, obtenidos en cada día de validación en DPPH

	Concentración real (mM)	Concentración calculada promedio (mM)	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (%)	Error relativo (%)
DÍA 1	0,14	0,14	0,00	1,2	-0,9
	0,29	0,27	0,01	3,5	-5,8
	0,47	0,48	0,01	1,5	0,9
DÍA 2	0,15	0,15	0,01	5,1	5,3
	0,29	0,30	0,01	1,6	3,5
	0,48	0,50	0,01	1,5	3,7
DÍA 3	0,14	0,14	0,01	6,3	1,2
	0,28	0,27	0,01	3,6	-2,3
	0,47	0,47	0,01	1,0	1,1

Tabla 18. Resultados de repetibilidad y exactitud intra-día, obtenidos en cada día de validación en FRAP

	Concentración real (mM)	Concentración calculada promedio (mM)	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (%)	Error relativo (%)
DÍA 1	0,10	0,10	0,00	2,5	3,5
	0,44	0,44	0,01	2,0	1,2
	0,68	0,69	0,02	2,7	1,3
DÍA 2	0,10	0,10	0,00	4,5	1,2
	0,44	0,43	0,01	2,9	-0,8
	0,68	0,66	0,00	0,6	-2,4
DÍA 3	0,10	0,10	0,00	1,3	0,4
	0,44	0,44	0,00	0,7	-1,1
	0,68	0,67	0,01	1,1	-2,6

Tabla 19. Resultados de repetibilidad y exactitud intra-día, obtenidos en cada día de validación en Folin-Ciocalteu

	Concentración real (mM)	Concentración calculada promedio (mM)	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (%)	Error relativo (%)
DÍA 1	0,49	0,49	0,01	2,8	3,5
	1,17	1,20	0,02	2,0	1,2
	3,13	3,20	0,03	2,7	1,3
DÍA 2	0,48	0,47	0,02	4,5	1,2
	1,14	1,22	0,02	2,9	-0,8
	3,05	3,15	0,034	0,6	-2,4
DÍA 3	0,47	0,43	0,01	1,3	0,4
	1,13	1,16	0,00	0,7	-1,1
	3,02	3,14	0,06	1,1	-2,6

Tabla 20. Resultados de repetibilidad y exactitud intra-día, obtenidos en cada día de validación en $AlCl_3$

	Concentración real (ppm)	Concentración calculada promedio (ppm)	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (%)	Error relativo (%)
DÍA 1	4,85	4,76	0,10	2,1	-1,8
	14,54	13,92	0,21	1,5	-4,2
	22,29	21,83	0,18	0,8	-2,1
DÍA 2	4,80	4,92	0,06	1,2	2,6
	14,39	14,38	0,52	3,6	-0,1
	22,07	21,51	0,61	2,8	-2,5
DÍA 3	4,54	4,87	0,14	3,0	7,1
	13,62	13,64	0,22	1,6	-0,1
	20,89	20,24	0,24	1,2	-3,1

En las Tablas, se observa como el coeficiente de variación fue inferior al 5% en todos los casos, salvo en los métodos ABTS y DPPH (Tablas 16 y 17), donde hay un par de valores cercanos al 6%. Respecto al error relativo, todos los valores obtenidos fueron menores del 5%, excepto para el método del $AlCl_3$ donde se obtuvo un valor del 7,1% (Tabla 20). Aun así, los valores mayores son aceptables, al estar todos por debajo del 10%.

También se han recogido los valores de exactitud y precisión intermedia (inter-día), obtenidos en los tres días de validación:

Tabla 21. Resultados de precisión intermedia y exactitud inter-día en ABTS

Concentración real (mM)	Concentración calculada promedio (mM)	Desviación Típica (SD)	Coeficiente de variación (%)	Error Relativo (%)
0,20	0,20	0,01	2,7	2,5
0,69	0,69	0,01	1,8	1,0
1,47	1,48	0,05	3,3	0,8

Tabla 22. Resultados de precisión intermedia y exactitud inter-día en DPPH

Concentración real (mM)	Concentración calculada promedio (mM)	Desviación Típica (SD)	Coeficiente de variación (%)	Error Relativo (%)
0,14	0,14	0,02	11,7	1,9
0,28	0,28	0,02	5,6	-1,5
0,47	0,48	0,01	2,0	1,9

Tabla 23. Resultados de precisión intermedia y exactitud inter-día en FRAP

Concentración real (mM)	Concentración calculada promedio (mM)	Desviación Típica (SD)	Coeficiente de variación (%)	Error Relativo (%)
0,10	0,10	0,00	1,5	1,7
0,44	0,44	0,01	1,2	-0,2
0,68	0,67	0,02	2,2	-1,2

Tabla 24. Resultados de precisión intermedia y exactitud inter-día en Folin-Ciocalteu

Concentración real (mM)	Concentración calculada promedio (mM)	Desviación Típica (SD)	Coeficiente de variación (%)	Error Relativo (%)
0,48	0,46	0,04	7,5	-3,3
1,15	1,19	0,03	2,5	3,9
3,06	3,16	0,03	1,1	3,2

Tabla 25. Resultados de precisión intermedia y exactitud inter-día en $AlCl_3$

Concentración real (ppm)	Concentración calculada promedio (ppm)	Desviación Típica (SD)	Coeficiente de variación (%)	Error Relativo (%)
4,73	4,85	0,08	1,7	2,6
14,18	13,98	0,37	2,7	-1,4
21,75	21,19	0,84	4,0	-2,6

Siguiendo la guía de validación para métodos bioanalíticos M10 de ICH, para analizar la exactitud y la precisión tanto el CV, como el error relativo deben ser inferiores al 15%, excepto en el control con menor concentración donde se permite hasta un 20%. En el caso de la exactitud intra-día todos los casos tuvieron un coeficiente de variación inferior al 5%, salvo las dos excepciones nombradas en el párrafo anterior. Respecto a la precisión intra-día, todos los errores relativos fueron menores del 5%, salvo un valor de 7,1% en $AlCl_3$ (Tabla 25).

En lo que respecta a la exactitud y precisión inter-día, en todos los casos hubo errores relativos inferiores al 5%, cumpliendo con los criterios más estrictos, que son los de la guía de la AEFI. Para evaluar la precisión, los métodos Folin-Cioclateu (Tabla 24) y DPPH (Tabla 22) son los únicos con algún valor por encima del 5%. En el caso de Folin-Cioclateu, este valor es inferior al 8%, por lo que se puede considerar un valor aceptable al estar por debajo del 10%. Mientras que en el caso de DPPH, el valor es del 11,7% estando dentro de los criterios de la guía ICH M10.

El método que presentó mayor precisión fue FRAP (Tabla 23), ya que tuvo los CV más bajos. Por el contrario, el método DPPH fue el menos preciso. Esto significa que los resultados estuvieron más próximos entre sí en el método FRAP. Respecto a la exactitud, también fue el método FRAP con el que se consiguió una mayor proximidad entre el valor de referencia (concentración teórica) y el obtenido experimentalmente, mientras que el método con mayores errores relativos fue el de Folin-Ciocalteu (Tabla 24), lo cual queda reflejado en el ANOVA, donde no se cumplió con la condición que evaluaba la linealidad de los resultados.

Para explicar la menor precisión de DPPH, se puede recurrir al trabajo citado anteriormente donde se exponen los distintos factores que pueden afectar al desarrollo de la reacción del DPPH. Además, un elemento que también pudo influir fue la concentración de antioxidante, ya que las moléculas con estructuras con cierta complejidad, como es el caso del Trolox, pueden dificultar el acceso al DPPH en concentraciones bajas, llegando a bloquear la reacción si la concentración es muy elevada (Schaich et al., 2015). Además, al tomar volúmenes pequeños, como ha sido en este caso, el error asociado es mayor.

Sin embargo, en el método Folin-Ciocalteu tiene gran relevancia tanto el orden como el momento en el que se adicionan los distintos reactivos. Otro factor que podría influir en el resultado final es que carece de especificidad, y la presencia de moléculas reductoras no fenólicas podrían interferir en la reacción de oxidación total (Chen et al., 2015).

Una vez demostrada la exactitud y precisión de los métodos mediante el uso de controles externos, se realizó un estudio de recuperación en vino tinto para comprobar la selectividad, precisión y exactitud del método para el análisis de este tipo de muestras. Así, se analizaron tres muestras de vino sin adición de estándar, y otras tres muestras con adición de una cantidad conocida de antioxidantes. A partir de la diferencia en las concentraciones obtenidas entre ambos tipos de muestras se determinó el porcentaje de recuperación para estos métodos. A continuación, se muestra la Tabla 26, con los datos obtenidos en cada método.

Tabla 26. Datos del porcentaje de recuperación y coeficiente de variación en todos los métodos

	ABTS	DPPH	FRAP	Folin-Ciocalteu	$AlCl_3$
Recuperación (%)	89,4	108,9	104,1	97,0	99,1
CV (%)	3,8	1,4	1,0	0,4	0,5

Los porcentajes de recuperación fueron todos superiores al 86%, obteniendo el mayor en el método Folin-Ciocalteu (95,2%). Respecto al coeficiente de variación entre las 3 repeticiones que se hicieron para cada uno de los métodos, en todos los casos, se obtuvieron valores inferiores al 4%, lo que significa que los resultados obtenidos fueron precisos.

4.1.4. Límites de detección y cuantificación

El límite de detección del método analítico fue calculado a partir de la desviación estándar de la regresión (S_r) y de la pendiente de la curva de calibración (b), por medio de la expresión LD = 3,3 S_r/b. El valor obtenido para cada método queda reflejado en la Tabla 27.

Tabla 27. Límites de detección en todos los métodos ensayados

ABTS (mM)	DPPH (mM)	FRAP (mM)	Folin-Ciocalteu (mM)	$AlCl_3$ (ppm)
0,09	0,04	0,03	0,21	0,94

Respecto al límite de cuantificación, se estableció el valor de concentración del estándar más diluido de la curva de calibración como la mínima concentración de analito que puede ser analizada por este método con un valor aceptable de precisión y exactitud (CV y errores relativos inferiores al 15%). Así, para comprobar experimentalmente la validez del límite de cuantificación seleccionado, se prepararon tres estándares de esa concentración en los tres días de validación, y se determinó su exactitud y su precisión en cada caso. A continuación, se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 28. Resultados de exactitud y precisión del límite de cuantificación para ABTS

	Concentración real (mM)	Concentración calculada promedio (mM)	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (%)	Error relativo (%)
Precisión y exactitud **intra-día**					
Día 1	0,10	0,11	0,00	1,6	6,1
Día 2	0,10	0,11	0,01	4,3	8,5
Día 3	0,10	0,10	0,00	3,0	0,0
Precisión y exactitud **inter-día**					
	0,10	0,10	0,00	4,2	4,9

Tabla 29. Resultados de exactitud y precisión del límite de cuantificación para DPPH

	Concentración real (mM)	Concentración calculada promedio (mM)	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (%)	Error relativo (%)
		Precisión y exactitud **intra-día**			
Día 1	0,10	0,09	0,00	2,9	-9,9
Día 2	0,10	0,11	0,00	2,3	4,7
Día 3	0,10	0,09	0,00	0,5	-7,1
		Precisión y exactitud **inter-día**			
	0,10	0,09	0,01	6,9	-4,0

Tabla 30. Resultados de exactitud y precisión del límite de cuantificación para FRAP

	Concentración real (mM)	Concentración calculada promedio (mM)	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (%)	Error relativo (%)
		Precisión y exactitud **intra-día**			
Día 1	0,05	0,05	0,00	1,5	12,3
Día 2	0,05	0,05	0,00	2,0	10,9
Día 3	0,05	0,05	0,00	1,6	12,0
		Precisión y exactitud **inter-día**			
	0,05	0,05	0,00	1,1	11,7

Tabla 31. Resultados de exactitud y precisión del límite de cuantificación para Folin-Ciocalteu

	Concentración real (mM)	Concentración calculada promedio (mM)	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (%)	Error relativo (%)
		Precisión y exactitud **intra-día**			
Día 1	0,41	0,40	0,00	0,6	-1,8
Día 2	0,40	0,38	0,01	2,0	-3,7
Día 3	0,41	0,36	0,01	1,5	-12,8
		Precisión y exactitud **inter-día**			
	0,40	0,38	0,02	5,8	-6,1

Tabla 32. Resultados de exactitud y precisión del límite de cuantificación de $AlCl_3$

	Concentración real (ppm)	Concentración calculada promedio (ppm)	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (%)	Error relativo (%)
Precisión y exactitud **intra-día**					
Día 1	2,91	3,24	0,07	2,0	11,1
Día 2	2,82	2,93	0,09	2,9	4,1
Día 3	2,59	2,71	0,02	0,8	4,9
Precisión y exactitud **inter-día**					
	2,77	2,96	0,26	8,9	6,8

Tal y como se puede comprobar, en todos los casos se encontraron valores de coeficiente de variación y error relativo inferiores al 15%, por lo que entran dentro de los criterios de aceptación. Cabe destacar que donde se encontraron errores relativos más elevados fue en el método FRAP (Tabla 30), obteniendo en el resto de métodos errores por debajo del 10%, salvo en dos excepciones: un error relativo intra-día de -12,8% en el método de Folin – Ciocalteu (Tabla 31) y un error relativo intra-día de 11,1% en el método del $AlCl_3$ (Tabla 32).

A pesar de encontrarse dentro de los niveles de aceptación para los límites de cuantificación, los errores obtenidos en este nivel de concentración fueron superiores a los observados en los controles estudiados dentro del rango de calibración (Apartado 4.1.2. c). Ello significa que sería posible reducir el error en los límites de cuantificación a valores inferiores al 5% si se modificara el rango de calibración y se utilizara el siguiente nivel de concentración (que correspondería a la concentración de los controles más diluidos estudiados, cuya exactitud ha sido demostrada) como estándar más bajo de la curva. Sin embargo, teniendo en cuenta que es necesario diluir las muestras de vino para que puedan entrar en el rango de calibración lineal, se espera trabajar con valores de concentración en las muestras cerca de la mitad de la recta, donde se han demostrado buenos niveles de exactitud y precisión. Por tanto, no se consideró necesario modificar el rango de calibración.

4.1.5. Estabilidad de la disolución madre

Para evaluar la estabilidad de las disoluciones madre utilizadas en cada análisis, se guardaron en refrigeración y se analizaron pasado un tiempo.

Aunque los errores obtenidos al analizar las disoluciones madres de Trolox (métodos ABTS, DPPH y FRAP) tras un mes en refrigeración fueron bajos (inferiores al 10%), se encontraron por encima del límite observado en validación (5%). Al segundo mes, se volvieron a analizar y los errores resultaron ser superiores al 10%. Esto indica una falta de estabilidad, desde el primer mes en el caso de las disoluciones madre preparadas con Trolox.

La estabilidad del Trolox según el fabricante, es de aproximadamente un mes en condiciones de -20ºC. En este caso, el Trolox se almacenó en un frigorífico donde no se alcanza esa temperatura, por lo que su estabilidad disminuye. Los antioxidantes, suelen ser inestables a temperaturas elevadas, además, a temperatura ambiente, las enzimas, productos químicos y el paso del tiempo pueden disminuir su actividad antioxidante (Carocho et al., 2018).

En el método Folin-Ciocalteu, donde se usó ácido gálico como antioxidante, las muestras se analizaron pasado un mes, obteniendo errores por debajo del 5%, a los dos meses se volvieron a evaluar y los errores

habían aumentado. Por ello, la estabilidad del ácido gálico es superior a la del Trolox, pero aun así se ve afectada con el tiempo.

La estabilidad de la quercetina, polifenol utilizado en el método $AlCl_3$, se analizó pasados casi dos meses y presentó errores entre el 5 y 10 %. Por ello, aunque presentó mayor estabilidad que el Trolox su estabilidad también se vio alterada con el tiempo.

Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en otro estudio realizado por el grupo de investigación donde se ha llevado a cabo el presente trabajo (Esparza et al., 2020). En dicho trabajo se analizó la estabilidad química de los compuestos fenólicos identificados en extractos secos de raspón de uva Mazuelo frente a diferentes condiciones de luz y temperatura durante 6 meses. Los extractos analizados presentaban tanto ácido gálico como quercetina en su composición. El ácido gálico permaneció prácticamente constante a lo largo de los 6 meses de estudio en las diferentes formas de conservación. Sin embargo, la quercetina disminuyó progresivamente hasta los 4 meses, momento a partir del cual se estabilizó.

En este trabajo se analizó la estabilidad estando los compuestos en disolución, por lo que es de esperar que la estabilidad sea inferior en disolución que en un extracto sólido.

Al no haber realizado un estudio de la estabilidad en tiempos inferiores, no se puede saber con exactitud durante cuánto tiempo permanecen estables los diferentes antioxidantes estudiados. Por ello, se concluyó que es necesario preparar los estándares a partir de una madre fresca (recién preparada a partir del reactivo en forma sólida convenientemente conservado) cada vez que se vayan a utilizar.

4.2. Muestras de vino

Una vez validados los métodos analíticos, se analizaron muestras de vino obtenidas con distintos tipos y cantidades de antioxidantes (con y sin SO_2, con extractos de raspón de 2 variedades distintas de uva, con raspón molido de las mismas variedades de uva, o con combinaciones de ellos) y mantenidos en botella durante dos años en condiciones de bodega. Para ello, se utilizaron las rectas validadas que se han presentado en los anteriores apartados de la presente memoria.

Para analizar la capacidad antioxidante, se usaron los 3 métodos validados (ABTS, DPPH y FRAP), ya que no existe un único método global y cada método presenta un mecanismo de acción y otras características específicas diferentes. En las Figuras 3, 4 y 5 se muestran los resultados de capacidad antioxidante obtenidos con cada uno de estos métodos. En el ensayo ABTS (Figura 3) se obtuvieron los mayores valores de capacidad antioxidante de los vinos analizados, seguido por FRAP (Figura 5). Finalmente, respecto a los tratamientos aplicados, la mayor concentración de antioxidantes se observó al añadir una combinación de SO_2 y extracto de raspón de la variedad Tempranillo (0,02 g/l SO_2 y 0,1 g/l extracto) a los vinos analizados.

Como se ha comentado en el párrafo anterior, en el ensayo de ABTS se encontraron los mayores valores de capacidad antioxidante en comparación con DPPH y FRAP cuyos valores eran más similares. Pese a que los métodos ABTS y DPPH tienen el mismo mecanismo de acción principal, la transferencia de electrones, en ambos métodos también se puede dar la transferencia de átomos de hidrógeno. Sin embargo, este modo de acción “secundario” es más importante en ABTS que en DPPH lo que podría explicar esa diferencia en los resultados. Además, la posición del radical en la molécula de DPPH es menos accesible lo cual puede limitar la reacción. Por otro lado, el método FRAP se basa en la capacidad de los antioxidantes de reducir el hierro de Fe^{3+} a Fe^{2+} (Esparza et al., 2020a).

En un estudio previo realizado en este grupo de investigación (Esparza et al., 2020b) se analizó la sustitución parcial de SO_2 por un extracto comercial de madera de vid y un extracto de raspón de uva Mazuelo. Respecto a la capacidad antioxidante determinada en los vinos obtenidos mediante la adición de distintos conservantes, encontraron que no había diferencias estadísticas entre las diferentes muestras tras un año almacenado debido a la posible interacción del SO_2 con distintas moléculas como azucares y compuestos fenólicos durante el proceso de vinificación, perdiendo así su capacidad antioxidante.

Esta explicación concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, donde las muestras estuvieron almacenadas durante 2 años.

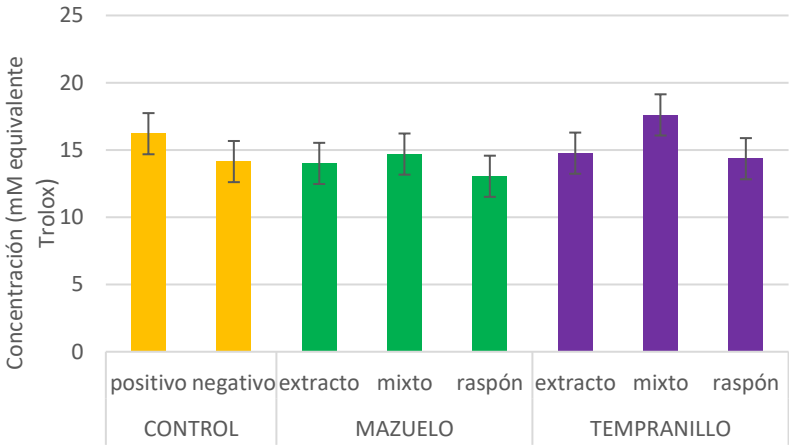

Figura 3. Concentración de las distintas muestras en ABTS

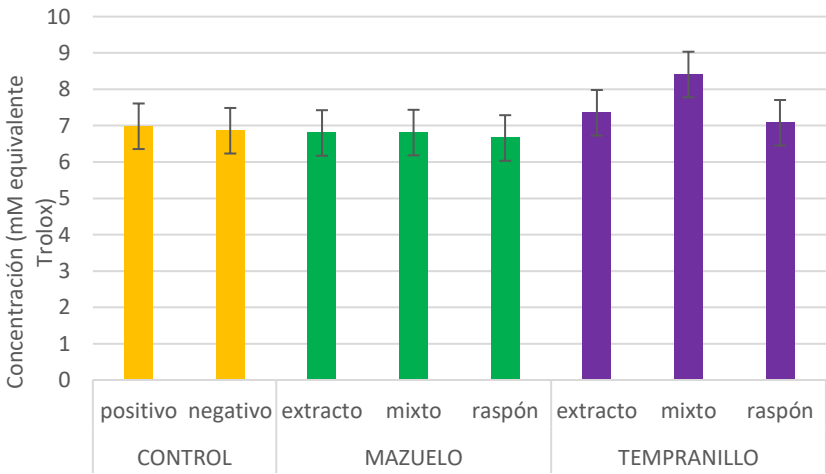

Figura 4. Concentración de las distintas muestras en DPPH

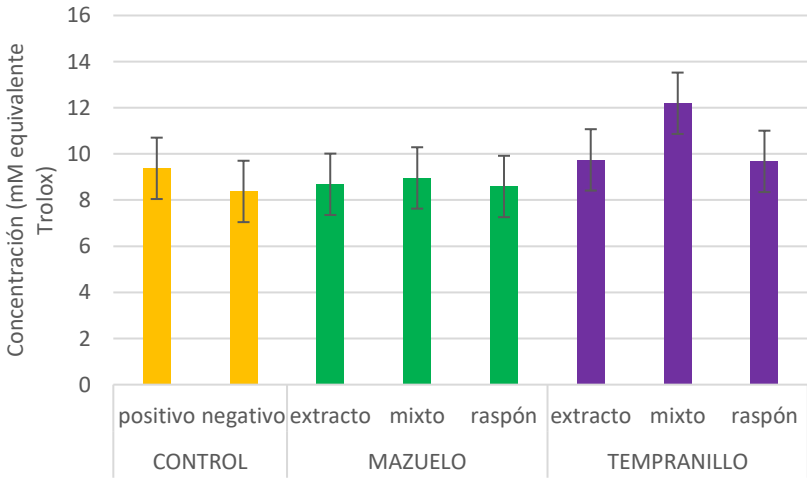

Figura 5. Concentración de las distintas muestras en FRAP

Respecto al contenido fenólico total determinado mediante el método Folin-Ciocalteu (Figura 6), el mayor valor (aprox. 12 mM equivalente de ácido gálico) se encontró también en los vinos obtenidos mediante un tratamiento mixto con SO_2 y extracto de raspón Tempranillo.

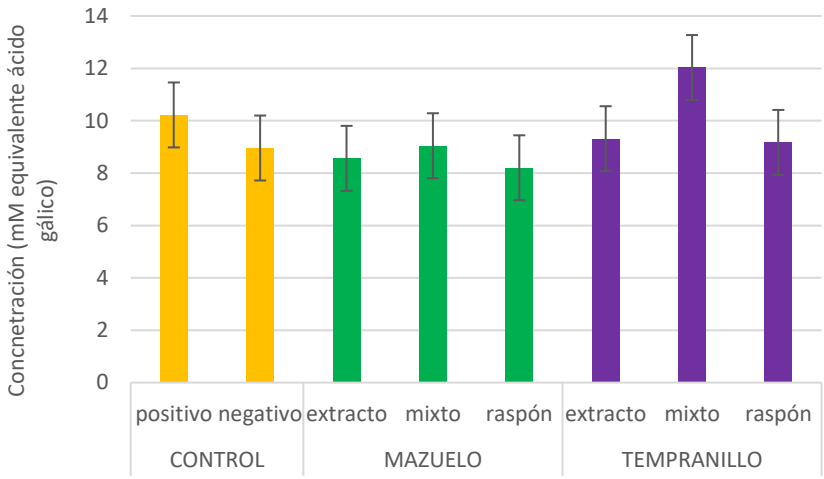

Figura 6. Concentración de las distintas muestras en Folin-Ciocalteu

El contenido de flavonoides de los vinos analizados se presenta en la Figura 7. Las muestras que presentaron la mayor concentración de estos compuestos fueron las muestras de control positivo y del tratamiento mixto de Tempranillo, que alcanzó prácticamente 80 ppm equivalentes de quercetina.

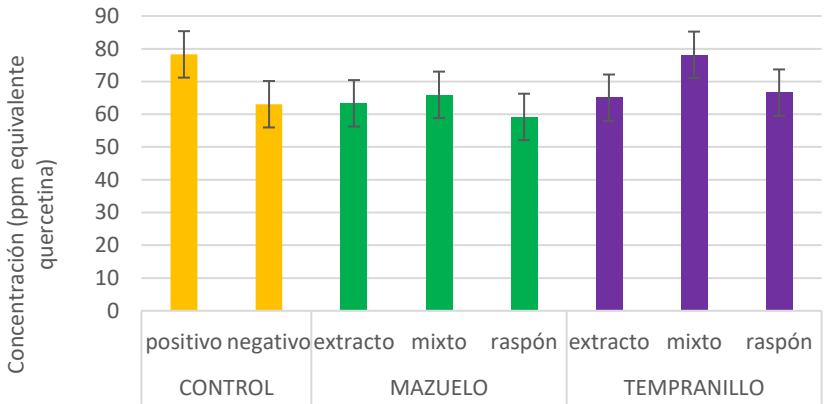

Figura 7. Concentración de las distintas muestras en $AlCl_3$

Finalmente, se evaluó la concentración de antocianinas mediante el método del pH diferencial propuesto por la AOAC Official Method 2005.02. Este método se basa en el cambio de color de los pigmentos de las antocianinas en función del pH y la longitud de onda. Para obtener los pigmentos de antocianinas se utilizó la fórmula descrita en el apartado 3.2. Es el único método que no fue necesario validar. En la Figura 8 se muestran los resultados obtenidos.

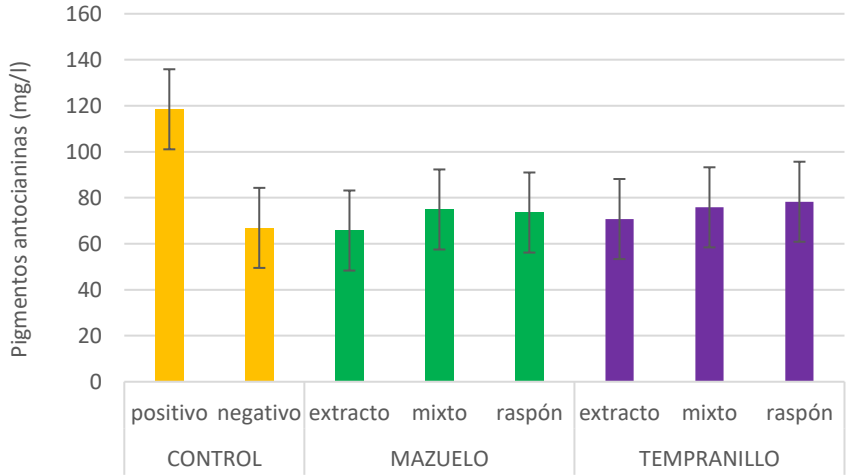

Figura 8. Pigmentos de antocianinas

La mayor concentración de antocianinas se observó en el control positivo que presentó una diferencia importante respecto con el control negativo. Los vinos con adición de extractos, raspón molido o tratamientos mixtos presentaron concentraciones de antocianinas muy similares a la del control negativo.

La diferencia de pigmentos de antocianinas en el control positivo se puede deber a que contiene una mayor concentración de dióxido de azufre (0,06 g/l) en comparación con el resto de muestras (0,00 a 0,02 g/l). El SO_2 al comienzo de la vinificación favorece la ruptura de los tejidos celulares de las uvas, favoreciendo la liberación de compuestos solubles como son las antocianinas (Martínez-Inda, 2019).

El conservante de vino más utilizado es el SO_2, pese a tener varios inconvenientes como la toxicidad, el deterioro de las propiedades organolépticas y que parte de la población tiene sensibilidad a este compuesto. Por ello, se buscan alternativas para sustituirlo o reducir la cantidad añadida durante el proceso de vinificación. Una de ellas es la adición de raspón de uva, ya que posee un elevado porcentaje de compuestos fenólicos, además de acción antimicrobiana. En el estudio previo realizado en este grupo de investigación (Esparza et al., 2020), se concluyó que la capacidad antioxidante entre los distintos vinos tras un año embotellados fue similar, mientras que se encontraron había pequeñas diferencias en el contenido fenólico de las muestras sometidas a distintos tratamientos.

En las muestras analizadas en el presente trabajo, se puede llegar a las mismas conclusiones. Pese a que en el control positivo se ha obtenido una mayor concentración de compuestos fenólicos, las diferencias entre los distintos tratamientos no han sido muy elevadas. Además, parece que esta diferencia ha podido ser debida a una mayor extracción de compuesto fenólicos por la acción del SO_2 al inicio del proceso de vinificación (maceración y fermentación alcohólica), y que se ha mantenido incluso tras 2 años de envejecimiento de los vinos en botella.

Finalmente, tras la validación de los 5 métodos estudiados, se concluye que son métodos fiables que dan resultados con unos niveles de precisión y exactitud adecuados. Esto se ha comprobado con el análisis de las distintas muestras de vino mediante estos métodos validados. Los resultados de los vinos concuerdan con los obtenidos en otros estudios, además el uso de las validaciones facilitó el trabajo en su análisis.

5. Conclusiones

Las conclusiones a las que se ha llegado en este trabajo tras la validación de los cinco métodos espectrofotométricos son:

- Ha sido posible validar los cinco métodos espectrofotométricos analíticos, garantizando una determinada precisión y exactitud en cada método. Además, de conseguir fiabilidad en los resultados que se obtienen a través de ellos.

- La validación de métodos facilita el trabajo rutinario de laboratorio, ya que reduce los errores, el tiempo empleado, y el coste. También, aumenta la fiabilidad de los resultados obtenidos y el conocimiento sobre el método.

- La reducción del conservante SO_2 en los vinos gracias a la adición de raspones o sus extractos es una opción que permite mantener una capacidad antioxidante similar.

6. Bibliografía

Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (2001). *Validación de métodos analíticos*. AEFI

Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, *239*(1), 70-76. https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, *28*(1), 25-30. https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5

Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, *71*, 107-120. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.008

Chandra, S., Khan, S., Avula, B., Lata, H., Yang, M. H., ElSohly, M. A., & Khan, I. A. (2014). Assessment of Total Phenolic and Flavonoid Content, Antioxidant Properties, and Yield of Aeroponically and Conventionally Grown Leafy Vegetables and Fruit Crops: A Comparative Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2014*, 1-9. https://doi.org/10.1155/2014/253875

Chen, L.-Y., Cheng, C.-W., & Liang, J.-Y. (2015). Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food Chemistry*, *170*, 10-15. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.038

Diez de la Iglesia, L. (2018). Métodos analíticos para la determinación de antioxidantes en olivas. Trabajo Fin de Grado. Universidad Complutense de Madrid. Disponible en https://eprints.ucm.es/id/eprint/62677/

Esparza, I., Cimminelli, M. J., Moler, J. A., Jiménez-Moreno, N., & Ancín-Azpilicueta, C. (2020a). Stability of Phenolic Compounds in Grape Stem Extracts. *Antioxidants*, *9*(8). https://doi.org/10.3390/antiox9080720

Esparza, I., Martínez-Inda, B., Cimminelli, M. J., Jimeno-Mendoza, M. C., Moler, J. A., Jiménez-Moreno, N., & Ancín-Azpilicueta, C. (2020b). Reducing SO2 Doses in Red Wines by Using Grape Stem Extracts as Antioxidants. *Biomolecules*, *10*(10). https://doi.org/10.3390/biom10101369

Esparza, I., Moler, J. A., Arteta, M., Jiménez-Moreno, N., & Ancín-Azpilicueta, C. (2021). Phenolic Composition of Grape Stems from Different Spanish Varieties and Vintages. *Biomolecules*, *11*(8). https://doi.org/10.3390/biom11081221

Espinosa Manrique, W. E., Garzón Salcedo, L. C. A., & Medina Vargas, O. J. (2016). Validación de una metodología analítica para la cuantificación de polifenoles totales, en procesos de extracción asistida por microondas sobre frutos de la especie colombiana Vaccinium meridionale. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, *45*(1), 109-126. https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v45n1.58023

Gobierno de Navarra. Plan de residuos de Navarra 2017-2027. Disponible en https://gobiernoabierto.navarra.es/es/participacion/procesos-de-participacion/propuestas-gobierno/plan-residuos-navarra-2017-2027

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(6), 1841-1856. https://doi.org/10.1021/jf030723c

ICH (2019). Bioanalytical method validation M10. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-2b_en.pdf

Intergovernmental Panel on Climate Change (Ed.). (2014). Summary for Policymakers. En *Climate Change 2013 – The Physical Science Basis: Working Group I Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (pp. 1-30). Cambridge University Press; Cambridge Core. https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004

Jiménez-Moreno, N., Esparza, I., Bimbela, F., Gandía, L. M., & Ancín-Azpilicueta, C. (2020). Valorization of selected fruit and vegetable wastes as bioactive compounds: Opportunities and challenges. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *50*(20), 2061-2108. https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1694819

Lee, J., Durst, R. & Wrolstad, R. (2005). AOAC 2005.02: Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines- pH Differential Method.

Martínez Inda, B. (2019). *Efecto de la sustitución de SO2 por extracto de raspón en la calidad del vino Tempranillo*. 85.

Makuasa, D. A., & Ningsih, P. (2020). The Analysis of Total Flavonoid Levels In Young Leaves and Old Soursop Leaves (*Annona muricata* L.) Using UV-Vis Sepctrofotometry Methods. *Journal of Applied Science, Engineering, Technology, and Education*, *2*(1), 11-17. https://doi.org/10.35877/454RI.asci2133

Mercado, J. (2010). Determinación de la capacidad antioxidante de flavonoides de plantas medicinales e identificación por electroforesis capilar. Tesis Doctoral. Instituto Politécnico Nacional (UPIBI, Méjico). Disponible en https://tesis.ipn.mx/handle/123456789/23534

Merck (2021). Disponible en: https://www.merckmillipore.com/ES/es/product/Trolox-CAS-53188-07-1-Calbiochem,EMD_BIO-648471

Ortíz, W., Aguilera, Y., Rodríguez, M. E. J., Guzmán Mayancha, D. M., Cobo Salinas, H. M., & Bravo Sánchez, L. R. (2016). Desarrollo y Validación de Técnicas Espectrofotométricas para la Determinación de Flavonoides Totales, Basada en Quercetina, en las Hojas de Psidium guajava L. *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología*, *5*(3), 276-288.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*(9-10), 1231-1237. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3

Rivero-Pérez, M. D., Muñiz, P., & González-Sanjosé, M. L. (2007). Antioxidant Profile of Red Wines Evaluated by Total Antioxidant Capacity, Scavenger Activity, and Biomarkers of Oxidative Stress Methodologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(14), 5476-5483. https://doi.org/10.1021/jf070306q

Sanchez, J. M. (2017). Ordinary Least Squares with Laboratory Calibrations: A Practical Way to Show Students that This Fitting Model may Easily Yield Biased Results When Used Indiscriminately. *World Journal of Analytical Chemistry*, *5*(1), 1-8. https://doi.org/10.12691/wjac-5-1-1

Schaich, K. M., Tian, X., & Xie, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, *14*, 111-125. https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.043

Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, *18*, 820-897. https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018

Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R., & Dhaka, N. (2013). Potential applications of antioxidants – A review. *Journal of Pharmacy Research*, *7*(9), 828-835. https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.10.001

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. En *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1

Souquet, J.-M., Labarbe, B., Le Guernevé, Christine, Cheynier, V., & Moutounet, M. (2000). Phenolic Composition of Grape Stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(4), 1076-1080. https://doi.org/10.1021/jf991171u