

UNIVERSIDAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

MÁSTER EN ENOLOGÍA



**DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES EN VINOS
MEDIANTE UN SENSOR DE NANOPARTÍCULAS DE CERIO**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Autor: Tabita Ana Cenusa

Tutora y cotutora:

Pilar Aragón Revuelta

Patricia Noguera Murray

Valencia, Septiembre de 2016



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO RURAL

Datos personales

Nombre y apellidos: Tabita Ana, Cenusá

Datos del trabajo fin de máster

Título del TFM: Determinación de polifenoles en vino mediante un sensor de Nanopartículas de Cerio.

Lugar de realización y fecha: Valencia, septiembre de 2016

Titulación: Máster en enología

Tutora y cotutora: Pilar Aragón, Patricia Noguera.

Abstract

In this work we evaluate the use of Nanoparticles of Cerium (NPCe) immobilized on a surface of cellulose for the determination of total polyphenols in wine. The Cerium (IV) immobilized on the solid support is reduced to Cerium III (brown) with the presence of polyphenols. These changes of color, associated with change of oxidation state allow us to determine the total content of polyphenols in red, white and rose wines. For that purpose, it is necessary to obtain the image (scanning) and the analysis of the same. The characterization of the method has been carried out by determining parameters such as sensitivity, limit of detection and quantification, accuracy and selectivity, comparing the results with the official method Folin – Ciocalteu.

Key words

Nanoceria, polyphenolic compounds, wine.

Resumen

En este trabajo se evalúa el uso de Nanopartículas de Cerio (NPCe) inmovilizadas sobre una superficie de celulosa para la determinación de polifenoles totales en vino. El Cerio IV (amarillo) inmovilizado sobre el soporte sólido se reduce a Cerio III (marrón) con la presencia de polifenoles. Estos cambios de color asociados al cambio de estado de oxidación permiten determinar el contenido en polifenoles totales en vino tinto, blanco y rosado. Para ello es necesario la obtención de imagen (escaneo) y el análisis de la misma. La caracterización del método se ha llevado a cabo determinando parámetros de calidad como sensibilidad, límite de detección y cuantificación, precisión exactitud y selectividad, comparándolo con el método oficial Folin-Ciocalteu.

Palabras clave

Nanopartículas de Cerio, polifenoles, vino, Folin – Ciocalteu.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mis agradecimientos a todos aquellos que me han estado ayudando a la realización de este trabajo.

En primer lugar, quisiera agradecer a Dios por darme la oportunidad de seguir estudiando y estar en el laboratorio que tanto me gusta.

En segundo, a Dña. Pilar Aragón y Dña. Patricia Noguera por su ayuda, asesoramiento y consejos durante toda la realización del trabajo y por la paciencia que han tenido conmigo. También expresar mi agradecimiento a la Dra. Álvarez, del Departamento de Tecnología de Alimentos y al Dr. Cortell de la bodega El Villar, en Villar del Arzobispo, por su amabilidad, paciencia y las muestras que nos ha facilitado para su análisis.

En tercer lugar, a toda la familia que ha estado apoyándome.

Y por último a todos los compañeros del laboratorio.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	i
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 Historia del vino	9
1.2 Polifenoles en vino	9
1.2.1 Compuestos no flavonoides	11
1.2.2 Flavonoides.....	12
1.3 Métodos de análisis de polifenoles totales en vino	14
1.3.1 Método oficial.....	14
1.3.2 Índice de Folin- Ciocalteu (F – C)	16
1.3.3 Métodos cromatográficos	16
1.3.4 Determinación de polifenoles mediante sensores	16
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	19
2.1 Objetivos	20
2.2 Plan de trabajo.....	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1 Sensor.....	22
3.1.1 Reactivos.....	22
3.1.2 Tamaño de los filtros.....	22
3.1.3 Impregnación del soporte con NPCe.....	22
3.1.4 Formatos de aplicación de la muestra	23
3.1.5 Procedimiento.....	23
3.1.6 Riesgos.....	23
3.2 Folin Ciocalteu	23
3.2.1 Reactivos.....	23
3.2.2 Preparación de los patrones de calibración	23
3.2.3 Procedimiento.....	24
3.2.4 Riesgos.....	24
3.3 Parámetros de calidad.....	24
3.3.1 Límite de linealidad.....	24
3.3.2 Límite de detección	24
3.3.3 Límite de cualificación.....	24
3.3.4 Intervalo de trabajo.....	25
3.3.5 Sensibilidad.....	25
3.3.6 Método de adiciones múltiples.....	25

3.4 Muestras de vino	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1 Impregnación del soporte con NPCe.....	29
4.2 Cantidad de muestra	30
4.3 Tipos de soporte	30
4.4 Estabilidad del complejo coloreado	31
4.5 Formatos de aplicación de la muestra	32
4.6 Respuesta del sensor frente a catequina	33
4.7 Caracterización del método oficial.....	33
4.8 Comparación de métodos	34
4.9 Comprobación del método sobre muestras reales	34
4.10 Determinación de polifenoles totales con NPCe utilizando el método de adiciones múltiples de AG	35
4.11 Reproducibilidad interensayo.....	36
4.12 Propuesta de protocolo de uso del NPCe	36
4.13 Aplicación del método a muestras reales	37
5. CONCLUSIONES	39
6. BIBLIOGRAFÍA.....	41

Índice de tablas

Tabla 1. Contenido de polifenoles en diferentes partes de la uva, expresado en mg/Kg de bayas. Fuente: Blouin J. et al., (2012)	10
Tabla 2. Método Folin - Ciocalteu. Metodología estudiada por diferentes autores. Fuente: elaboración propia.	15
Tabla 3. Diferencias entre Folin – Ciocalteu y NPCe. Fuente: Sharpe et al., 2013.....	18
Tabla 4. Características filtros empleados. Fuente: proveedores.	22
Tabla 5. Muestras reales procedentes de diferentes bodegas analizadas.	26
Tabla 6. Ecuaciones de los soportes con diferente cantidad de NPCe.	29
Tabla 7. Ecuaciones de las rectas de calibrado	30
Tabla 8. Resultados obtenidos al analizar AG mediante el uso de Nanopartículas de Cerio (NPCe) n=10 y el método de referencia Folin – Ciocalteu (F-C) n=10 blancos	34
Tabla 10. Resultados de F – C y NPCe en vino Tinto y Blanco (Mercadona)	36
Tabla 12. Resultados de la determinación de GAE con Nanopartículas de Cerio y Folin – Ciocalteu en blancos.	37
Tabla 13. Resultados de la determinación de GAE con Nanopartículas de Cerio y Folin – Ciocalteu en tintos.....	37
Tabla 14. Resultados de la determinación de GAE con Nanopartículas de Cerio y Folin – Ciocalteu en rosados.	37
Tabla 15. Adición de patrón interno a F – C y comparación con F – C.....	38

Índice de figuras

Figura 1. Estructura básica de un fenol	10
Figura 2. Clasificación compuestos fenólicos. Fuente: elaboración propia.	10
Figura 3. Estructura básica del ácido benzoico y sus derivados.	11
Figura 4. Estructura básica del ácido cinámico y sus derivados.	11
Figura 5. Estructura química del resveratrol.	12
Figura 6. Estructura química de los principales flavonoides presentes en uvas tintas (a) catequina y (b) epicatequina.	13
Figura 7. Mecanismo de acción del reactivo Folin – Ciocalteu. Fuente: García Martínez et al., (2015).	14
Figura 8. Protocolo general para el método oficial Folin – Ciocalteu.	15
Figura 10. Diagrama de flujo del sensor de NPCe.	17
Figura 11. Formatos de aplicación de muestras, a) discos sumergidos en disoluciones patrón, b) formato de aplicación filtro impregnado con NPCe y gotas de patrones.	23
Figura 12. Curva de calibrado de respuesta en función de la concentración de analito.	25
Figura 13. Señal obtenida para soportes con diferente cantidad de CeO ₂	29
Figura 14. Señal obtenida para soportes con diferente cantidad de NPCe.	30
Figura 15. Papel de algodón.	31
Figura 16. Nitrocelulosa con impregnada con NPCe en las que se han depositado gotas con ácido gálico.	31
Figura 17. Comparación papel filtro Whatman y RM.	31
Figura 18. a) Filtro con gotas de diferentes concentraciones de AG b) filtro tras ser secado en la estufa c) filtro tras ser sumergido completamente en disolución patrón d) filtro al ser secado en la estufa. ...	32
Figura 20. Ajuste lineal de los resultados obtenidos con el formato de deposición de gotas sobre el soporte impregnado con NPCe 4%.	32
Figura 22. Recta calibrado de ácido gálico determinado por Folin – Ciocalteu (n=3) realizada en dos días diferentes.	33
Figura 23. Comparación señal NPCe y método oficial.	34
Figura 24. Rectas de calibrados con adición de patrón de ácido gálico sobre vino tinto (a) y blanco (b). Recta de calibrado del con ácido gálico (c). n° de repeticiones, n=10	35

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AG	Ácido gálico
CE	Equivalentes de catequina
GAE	Equivalentes de ácido gálico
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
NPCe	Nanopartículas de Cerio
OIV	Organización Internacional de la Viña y el Vino
SD	Desviación estándar
UV/VIS	Espectroscopia ultravioleta-visible

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Historia del vino

El vino tiene una larga historia y cada botella puede tener la suya propia, lo que contribuye a la fascinación por esta bebida. Pero su papel en la historia de nuestra cultura es incluso más amplio y más profundo. Se tiene constancia de que en civilizaciones como Babilonia ya se elaboraba vino hace 3000 años AC y en Egipto también se han hallado documentos iconográficos datados con una antigüedad de 2500 años AC de escenas relacionadas con la vinificación. Además, también podemos encontrar referencias en numerosos pasajes de la Biblia que hacen alusión al vino desde la época de Noé, enseñando la importancia que le daban los judíos de aquella época al vino.

Podríamos considerar a los griegos como los pioneros en el arte de conservar el vino, ya que le añadían brea, resina y especias para prolongar el tiempo de conservación, siendo el vino de resina aún hoy muy popular en Grecia (Benavent y Álvarez, 2003).

Durante siglos se ha afirmado que la vid llegó a las costas de la Península Ibérica de manos de fenicios y focenses. Estos pueblos trajeron probablemente las diferentes tecnologías e introdujeron nuevas variedades. La invasión árabe no supuso en España una catástrofe para el cultivo de la vid, salvo esporádicas órdenes de arranque por parte de almorávides y almohades (que afectaron a tierras fronterizas) ya que los musulmanes andaluces fueron permisivos con el consumo de vino y además fueron excelentes cultivadores (López – Alejandre, 2005).

Ya en los siglos XVI – XVII el cultivo de la vid y la elaboración de vino se generalizaron prácticamente en toda la península y durante el siglo XVIII se produjo un progreso importante con el cultivo de nuevas variedades de la vid procedentes de Francia, Italia y otros países mediterráneos. Pero fue en el siglo XIX cuando se originaron las innovaciones más importantes en la enología española, relacionadas en buena medida con la invasión de la filoxera en el año 1870 que supuso un gran desastre para los viñedos europeos, prácticamente destruidos y gracias al descubrimiento de la resistencia de las vides americanas a esta plaga se evitó un desastre más grande. En el ámbito de la elaboración, el siglo XX es de gran trascendencia para el vino por su control/evolución de su calidad (grado alcohólico, polifenoles etc). Los estudios realizados por Pasteur condujeron al conocimiento de las causas que ocasionaban la transformación del mosto de uva en vino lo que permitió un gran avance de la tecnología enológica (Benavent y Álvarez, 2003). Además, estos avances han permitido determinar que los polifenoles son compuestos antioxidantes que tienen un efecto protector contra enfermedades coronarias, cáncer, entre otras e inhiben y retrasan el estrés oxidativo de otras moléculas (Llobera, 2004, Garewall, 1997), lo que ha despertado gran interés hacia estas sustancias.

1.2 Polifenoles en vino

Los compuestos fenólicos son uno de los grupos fitoquímicos más grandes, de considerable importancia fisiológica y morfológica en las plantas. Estos compuestos juegan un papel relevante en el crecimiento y reproducción, proveyendo protección contra los patógenos y depredadores (Bravo, 1998). Además contribuyen al color y a las características sensoriales de las frutas y verduras (Alasalvar et al., 2001). Estos son biosintetizados en las plantas a través del metabolismo secundario y cumplen numerosas funciones biológicas que han permitido la adaptación y evolución de las distintas especies. Entre ellas se encuentran el transporte de hormonas, la atracción de agentes polinizadores, el crecimiento del tubo polínico y la fecundación, la dispersión de semillas, el establecimiento de relaciones simbióticas, la protección de los fotosistemas frente al daño oxidativo, las respuestas de defensa frente al ataque de patógenos y la tolerancia a condiciones abióticas desfavorables (Shirley, 1996).

Desde el punto de vista químico, los compuestos fenólicos incluyen una gran diversidad de compuestos químicos con estructuras químicas muy heterogéneas que se caracterizan por poseer al menos un núcleo bencénico, sustituido con uno o varios grupos hidroxilos y una cadena lateral funcional (**Figura 1**). Su reactividad se debe tanto al carácter ácido de la función fenólica como al

carácter nucleofílico que le confiere la alta densidad electrónica del anillo bencénico (Monagas et al., 2005).

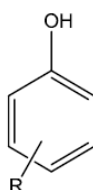


Figura 1. Estructura básica de un fenol

Los compuestos fenólicos pueden ser clasificados siguiendo varios criterios. De entre todos ellos, la clasificación más común empleada para describir la matriz fenólica de las uvas y los vinos se basa en su esqueleto carbonado, dividiéndose en compuestos no flavonoides y compuestos flavonoides, (**Figura 2**).

La composición polifenólica de los vinos depende de la variedad y otros factores que afectan al desarrollo de la uva, tales como el suelo, localización geográfica y condiciones climáticas (Neuza et al., 2007). En la pulpa de las uvas se encuentran compuestos no flavonoides, mientras que los compuestos flavonoides se localizan en la piel, semillas y racimo (**Tabla 1**).

Tabla 1. Contenido de polifenoles en diferentes partes de la uva, expresado en mg/Kg de bayas. Fuente: Blouin J. et al., (2012)

	Pulpa	Hollejos	Pepitas
Taninos	Trazas	100 a 500	1000 a 6000
Antocianos	0 ⁽¹⁾	500 a 3000 ⁽²⁾	0
Ácidos fenólicos	20 a 170	50 a 200	0

1. Excepto variedades tintoreras
2. Contenido en variedades tintas

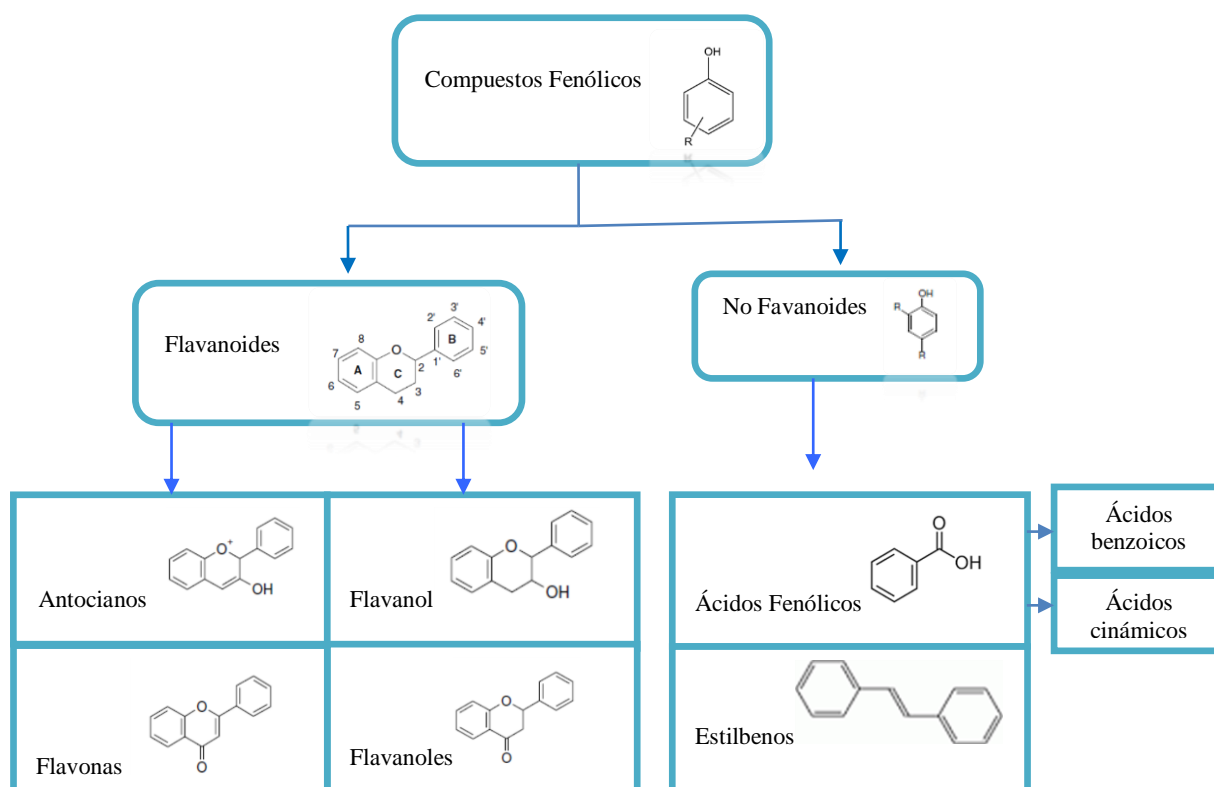


Figura 2. Clasificación compuestos fenólicos. Fuente: elaboración propia.

1.2.1 Compuestos no flavonoides

Seguidamente se va proceder a describir los compuestos no flavonoides que se clasifican en ácidos fenólicos (benzoicos y cinámicos) y estilbenos.

a) Los ácidos fenólicos

Estos son incoloros, inodoros e insípidos, aunque con el tiempo y la oxidación pueden adquirir o tornarse un color amarillento. Bajo la acción de algunos microorganismos, pueden transformarse en fenoles volátiles que presentan olores muy característicos.

Los vinos tintos contienen mayor cantidad de ácidos fenólicos que los blancos, encontrándose en concentraciones de 10 a 20 mg/L en los blancos y de 100 a 200 mg/L en los tintos (Ribereau – Gayon, 1976).

Los ácidos fenólicos se caracterizan por la presencia de un solo anillo bencénico en su molécula y se clasifica en dos grupos: ácidos benzoicos y ácidos cinámicos.

Los ácidos benzoicos se encuentran en las vacuolas del hollejo y la pulpa bajo la forma de ésteres tartáricos encontrándose en cantidades de dos a cien veces mayores en el hollejo que en pulpa, aunque depende de la variedad. Se consideran derivados del ácido p-hidroxibenzoico (**Figura 3**) como ácido p-hidroxibenzoico, ácido protocatéutico, ácido gálico, entre otros. Los ácidos protocatéutico y gálico proceden de los raspones y las pepitas especialmente este último aparece poco en los vinos como consecuencia del despalillado de las uvas.

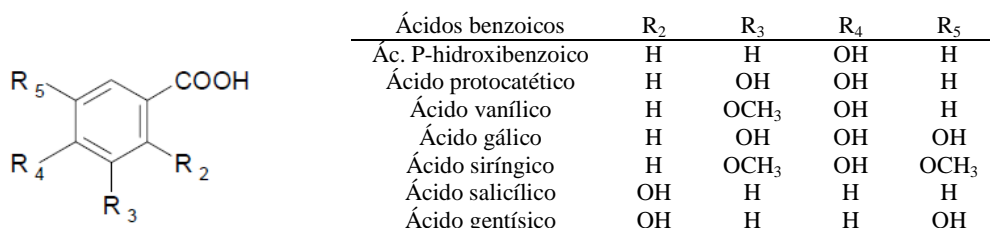


Figura 3. Estructura básica del ácido benzoico y sus derivados.

Los ácidos cinámicos se consideran derivados del ácido p-cumárico o ácido p-oxicinámico (**Figura 4**) y son: ácido p-cumárico, ácido caféico, ácido telúrico y ácido sináptico. El ácido p-cumárico se ve implicado en casos de acilación de los antocianos.

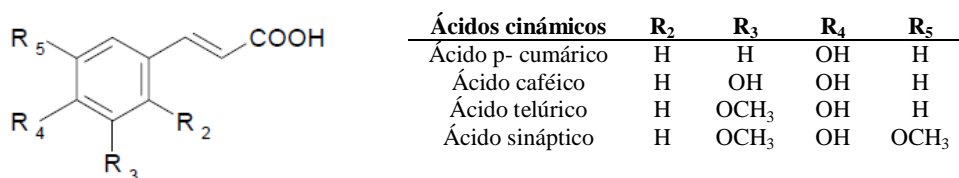


Figura 4. Estructura básica del ácido cinámico y sus derivados.

Respecto a la presencia de los ácidos fenólicos en uva y sus derivados, los ácidos benzoicos son poco abundantes en uva blanca y algo más en tinta (0,1 mg/L). Su mayor abundancia es en forma de ácido siríngico y de ácido vanílico. En barrica de varios años hay acumulación de vanílico y también gálico y elágico por hidrólisis del tanino del roble, liberando además azúcares.

Los ácidos cinámicos en uva y vino tinto están presentes sobre todo esterificados con el ácido tartárico. En vinos existen de 0,1 a 30 mg/L en combinación con ácido tartárico y antocianos. El p-

cumárico, al igual que el caféico está en concentraciones hasta los 100 mg/L en tintos y hasta 5 mg/L en blancos. Los ácidos cinámicos pueden presentar inestabilidad debido a la acción de la polifenoloxidasas sobre el caféico, derivando en colores pardos y están involucrados en los procesos de copigmentación con antocianos (Brouillard y Dangles, 1994).

b) Los estilbenos.

El más importante es el resveratrol (**Figura 5**). Se encuentra en los hollejos y está implicado en la resistencia de las bayas a los ataques fúngicos. Sus propiedades antioxidantes contribuyen a la calidad sanitaria de uvas y vinos.

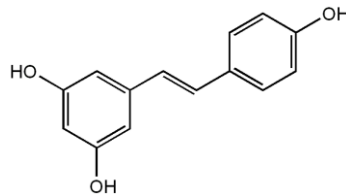


Figura 5. Estructura química del resveratrol.

El resveratrol existe en dos formas isómeras, *cis* y *trans*, que pueden aparecer glucosiladas. En una disolución hidroalcohólica, la estabilidad del resveratrol depende de la luz, la temperatura y el pH. De esta forma, se ha podido comprobar que el *trans*-resveratrol es estable durante meses cuando está protegido de la luz, excepto a pH mayor o igual a 10. La radiación ultravioleta desplaza el equilibrio isomérico hacia la formación de la forma *cis*. El isómero *cis* sólo es estable a pH cercanos a la neutralidad, un pH bajo favorece que la forma *cis* se isomerice a la *trans* que la forma estéricamente más estable.

La concentración de resveratrol oscila en vinos tintos entre 0,001 y 10 mg/L, en rosados entre 0,05 y 1,2 mg/L y en blancos desde trazas hasta 0,019 mg/L.

1.2.2 Flavonoides

Los flavonoides están caracterizados por tener hasta un esqueleto de base de 15 átomos de carbono constituidos por dos anillos bencénicos unidos por una cadena de tres átomos de carbono ciclada en un heterociclo oxigenado (Valls et al., 2000). Dentro de este grupo se encuentran los antocianos, flavonoles, flavanoles y flavonas (**Figura 2**).

a) Antocianos

Los antocianos (del griego Anthos = flor y Kianos = azul) son sustancias que caracterizan a las uvas y los vinos tintos en cuanto las formas que presentan coloraciones rojas y están ausentes en uvas y vinos blancos. Representan una parte importante tanto cuantitativa como cualitativamente de los flavonoides de las bayas de las uvas tintas y, en consecuencia, de los vinos resultantes (Valls et al., 2000).

Desde un punto de vista general, la estructura de los antocianos se caracteriza por dos anillos bencénicos unidos por un anillo heterocíclico que va a poder ser del tipo pirano o pirilo por asociación $C_6C_3C_6$ (De Rosa, 1988).

La acumulación de antocianos los hollejos se desarrolla paralelamente a los de los azúcares. En las variedades de pulpa coloreada, están presentes de 5 a 15 veces menos que en las células de piel, aunque depende de las condiciones meteorológicas, variedad y grado de maduración. (Alexandre et al., 2003).

Los antocianos presentan color rojo-violáceo, tanto más intenso cuanto más elevada sea la acidez real. El color es azulado o incoloro en medio neutro o ligeramente alcalino. Estos compuestos son pigmentos naturales que se encuentran en frutas y dan tonalidades de rojizas a azuladas, según el pH del medio.

b) Flavanoles

Están presentes en las semillas de la uva, aunque también existen en menor cantidad en la pared celular de los hollejos, en estado de monómeros y bajo formas más o menos polimerizadas.

Los monómeros más abundantes de los flavanoles en la uva son (+) catequina, y su isómero la (-) epicatequina (**Figura 6**). Otros flavanoles son la galocatequina y la epigalocatequina. La polimerización de estos monómeros da lugar a compuestos llamados taninos por su propiedad de combinarse con los prótidos y ocasionar su precipitación. La astringencia que producen es debida a la pérdida de propiedades lubricantes de la saliva por acción sobre las proteínas y glicoproteínas que contiene.

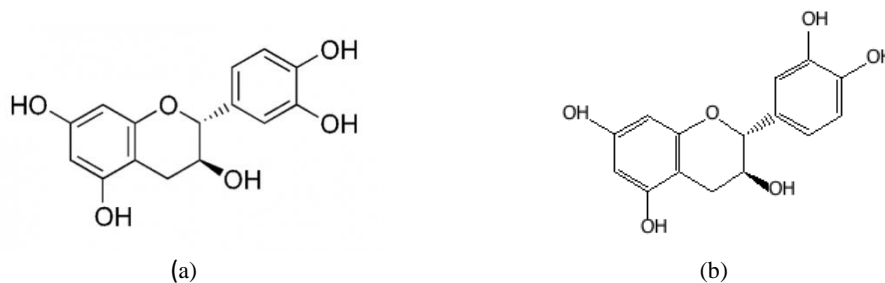


Figura 6. Estructura química de los principales flavonoides presentes en uvas tintas (a) catequina y (b) epicatequina.

Los monómeros podrían considerarse como los precursores de los taninos. La condensación de los monómeros es condición indispensable para que estos compuestos presenten características químicas y organolépticas de los taninos (peso molecular superior a 500), puesto que los monómeros y los polímeros de más de 10 monómeros no tienen características tánicas.

Los taninos que contiene de forma natural la uva, y por lo tanto los vinos, son los condensados. Los hidrolizables, o bien se utilizan como coadyudantes tecnológicos (auxiliares de fabricación), o bien están presentes en el corcho de los tapones.

c) Flavonoles

También los flavonoles, es decir, las flavonas que tienen en el carbono 3 un grupo OH forman parte del grupo de los flavonoides, están presentes tanto en los vinos blancos como en los vinos tintos. Su coloración característica es amarilla, enmascarada en los vinos tintos por el rojo violáceo de los antocianos.

d) Flavonas.

Estos compuestos constituyen una fracción minoritaria de los fenoles presentes en *Vitis vinifera*. En hojas se han identificado algunos glucósidos de apigenina y luteolina (Revilla et al., 1985; Hmamouchi et al., 1996).

1.3 Métodos de análisis de polifenoles totales en vino

Los compuestos fenólicos, además de poseer propiedades saludables, son responsables de las cualidades organolépticas del vino como el color, la estructura o su potencial para ser envejecidos. La composición y la carga fenólica están influidas por factores como la variedad de la uva y el estado de madurez de la misma, la maceración de los hollejos, las numerosas técnicas de vinificación y las diferentes reacciones que se dan durante el envejecimiento del mismo (Hernández – Saseta et al., 2015).

En enología es importante conocer el contenido en polifenoles, pues en un vino joven, el color depende de su composición en antocianos libres y sus copigmentos, y cuando el vino envejece, los antocianos libres desaparecen debido a su oxidación, o a su combinación directa con los flavanoles o mediada por el etanal. Las reacciones de los polifenoles y su degradación hacen que los compuestos fenólicos de los vinos tintos se modifiquen continuamente y se transformen en otras especies más estables, ocasionando pérdidas de color y astringencia durante su envejecimiento (Lizama V. et al., 2015).

1.3.1 Método oficial

El ensayo Folin Ciocalteu, para la determinación de polifenoles totales en vino, se basa en la transferencia de electrones en un medio alcalino de los compuestos fenólicos a los complejos de ácido fosfomolibdico azules ($H_3PMo_{12}O_{14}$) / fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) (**Figura 7**) (posiblemente $(PMoW_{11}O_{40})^{4-}$). Estos complejos se determinan espectroscópicamente a 760 nm (Singleton 1965 y 1999).

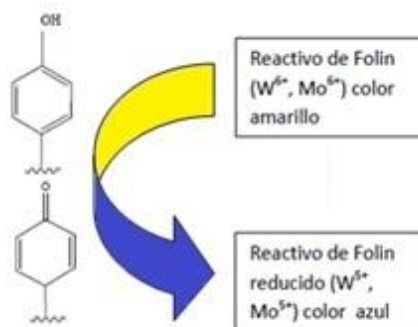


Figura 7. Mecanismo de acción del reactivo Folin – Ciocalteu. Fuente: García Martínez et al., (2015).

Esta reacción es una oxidorreducción, por lo que además se puede considerar como un método de medida de la actividad antioxidante. La velocidad depende del pH, siendo la reacción lenta a pH ácido y rápida a pH básico. En la bibliografía se encuentran pequeñas variantes en la determinación de polifenoles por el método de Folin – Ciocalteu, diversas maneras de obtener los polifenoles, pero en definitiva con los mismos reactivos, solamente cambiando la concentración y las condiciones (temperatura y el tiempo de espera) (**Tabla 2**).

Lo habitual es expresar el contenido en polifenoles totales en vino como equivalente de ácido gálico (GAE, Gallic acid equivalents), aunque otros autores los expresan como equivalentes de catequina (CE catequin equivalents). Para ello, es recomendable realizar una recta de calibrado utilizando ácido gálico o catequina.

De forma genérica en la **Figura 8**, se muestran las distintas etapas para determinar el índice de Polifenoles Totales en vino según el método oficial.

Tabla 2. Método Folin - Ciocalteu. Metodología estudiada por diferentes autores. Fuente: elaboración propia.

Autor	Volumen añadido					Tiempo espera	Rango trabajo	Abs (nm)	Expresado
	Vino	H ₂ O	Folin	Carbonato	H ₂ O				
Asensio A. (2000)	Alícuota	5 mL	1 mL esperar 5 min	4 mL al 10%	Hasta 20 mL	90 min		700	GAE
Ivanova V. et al., (2012)	1 mL (diluido aprop.)	5 mL	0,5 esperar 3 min	1,5 mL (2g/L)	Hasta 10 mL	16 min (50°C)	0-100 mg/L (0,53 mM)	765	GAE
Jasenska P. et al., (2005)	20 µL Tintos 1:10, Blancos 1:1	1,58 mL	100 µL	300 µL al 20%		30 min (40°C) 2h (20°C)	0, 50, 100, 250, 500 mg/L (2,66 mM)	765	GAE
Lei Z. et al., (2012)	vino tinto 1:20					30 min (40°C)	50-1000 µg AG/mL (5mM)		mg GAE/g peso seco
Minussi R. et al., (2003)	1 mL		25 µL	250 µL		30 min		700	GAE
OIV	1mL Tinto 1:5 Blanco 1:1	50 mL	5 mL	20 mL al 20%	hasta 100 mL	30 min		750	GAE
Rychecki L. (1996)	Alícuota	5 mL	1 mL	4 mL al 10%		90 min	5-30 mg/L (0, 159 mM)	700	CE
Singleton y Rossi (1995)	0,25 mL Tinto 1:10 Blanco 1:1	1,25 mL	1,25 mL	5 mL al 20%	Hasta 25 mL	30 min	0-500 mg/L (2,66 mM)	750	GAE
Stevanato R. et al., (2004)	20 µL (1:5)	-	150 µL	600 µL al 15%	Hasta 3 mL	2 h		784	mg CAE
Stratil P. et al., (2006)							2 mM/L AG y cat. Lineal hasta 0,2mM/L	760	GAE

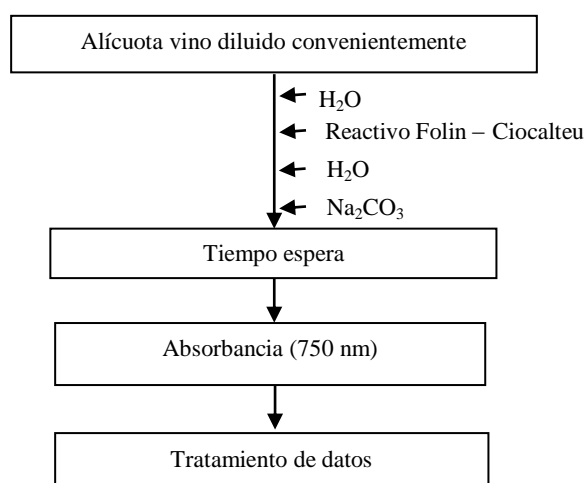


Figura 8. Protocolo general para el método oficial Folin – Ciocalteu.

1.3.2 Índice de Folin – Ciocalteu (F – C)

Para calcular el índice de F – C, la absorbancia obtenida del método oficial se multiplica por varios factores según el tipo de vino.

En el caso del tinto:

$$IFC = A_{750} \cdot \text{Factor de dilución (25)} \cdot 20$$

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

En el caso del blanco y rosado, se opera de la misma manera que en el caso anterior pero sin diluir el vino.

$$IFC = A_{750} \cdot 20$$

1.3.3 Métodos cromatográficos

Cuando se desea conocer la composición polifenólica del vino se recurre a métodos cromatográficos. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica de análisis en la cual los componentes de una mezcla se separan a partir de las diferencias de velocidad a la que son transportados a través de una fase estacionaria por una fase móvil, líquida. Con este método se separan, identifican y cuantifican los polifenoles que forman parte del vino. Sin embargo es necesario realizar una extracción y/o separación previa de sus componentes antes de la introducción en el cromatógrafo.

Para evitar tiempos de espera elevados y preparación de la muestra en varias fases, se ha encontrado en la bibliografía métodos cromatográficos más rápidos.

Kerem et al., (2004) han obtenido un método rápido para determinar los compuestos carboxílicos y fenólicos en vinos con una mínima preparación de la muestra mediante una columna polar para fenoles y una columna específica para los compuestos carboxílicos. En 30 minutos obtuvo los resultados.

Gruz et al., (2008) emplearon cromatografía líquida de alta eficacia (UPLC- MS/MS) obteniendo resultados en 5 minutos, con una mínima preparación de la muestra. El principal inconveniente es el coste de los equipos y de los reactivos.

Apers et al., (2004) utilizaron una columna monolítica que redujo más de dos veces el tiempo de separación de las isoflavonas comparado con la columna C18. Al igual que Chinnici et al., (2004) que separaron los compuestos fenólicos de manzana en menos de 20 minutos utilizando una columna monolítica en vez de la convencional. Liqid et al., (2010) determinaron polifenoles en uva y derivados mediante una cromatografía líquida utilizando columnas monolíticas en menos de 8 minutos.

Aunque todos estos son métodos son rápidos, es necesario tener equipos sofisticados y costosos, reactivos, columnas específicas, adecuar la muestra al HPLC o UPLC y todo esto supone un gran coste, no sólo económico sino de tiempo. Además requieren de personal especializado.

1.3.4 Determinación de polifenoles mediante sensores

Recientemente, con el desarrollo de la tecnología de sensores en la última década, los métodos rápidos están cobrando un mayor interés ya que permiten obtener información in situ y a bajo coste.

Las Nanopartículas de Cerio (NPCe) han atraído gran interés por sus propiedades catalíticas y redox (Karakoti et al., 2010). Esas propiedades se deben a su estado de oxidación reversible y esto hace que se pueda emplear para determinar antioxidantes (Andrei et al., 2016).

Andrei et al., (2016) determinan los antioxidantes de vinos tintos comerciales mediante un sensor electroquímico con Nanopartículas de Cerio inmovilizado sobre un electrodo. El Cerio induce la oxidación del compuesto a analizar y hace posible la detección de los antioxidantes.

Sharpe et al., (2015) aplican Nanopartículas de Cerio inmovilizadas sobre papel de filtro pero determinando polifenoles en té, café, cerveza, zumo de acay y de manzana. Éste es un método rápido y sencillo que consiste en la reducción de las Nanopartículas de óxido de Cerio por parte de los polifenoles, los cuales se traducen en cambio de color amarillo a marrón que puede ser observado a simple vista. El Cerio IV inmovilizado sobre el soporte sólido se reduce a Cerio III (marrón) con la presencia de polifenoles (**Figura 9**). Este cambio de color asociado al cambio de estado de oxidación permite determinar el contenido en polifenoles totales en vino tinto, blanco y rosado. Para ello es necesario la obtención de imagen (escaneo) y el análisis de la misma.

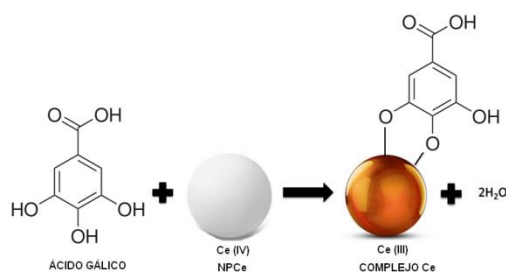


Figura 9. Reacción entre las NPCe y un polifenol (ácido gálico). Fuente: elaboración propia basado en Sharpe et al., (2015).

Ese cambio de color depende de la sustancia y de su concentración. Esos cambios de color también son unos indicativos del poder reductor del antioxidante y su habilidad para ligarse a la superficie de Cerio. Las partículas se estabilizan a través de la formación de puentes de hidrógeno entre los OH de la superficie del Cerio y las fibras de celulosa (Sharpe et al., 2013).

Como resultado de la transferencia del electrón del polifenol, se forma un radical intermedio que proporciona a la superficie una carga donde se realiza el cambio de color. Este cambio de color es único para cada sustancia. Y gracias a este color se determina la cantidad de ácido gálico (Sharpe et al., 2015).

Una posible aplicación de este tipo de NP sería para la determinación de Polifenoles Totales (PT) en vinos. El esquema a seguir sería el descrito en la **Figura 10**, en el que tras inmovilizar las NPCe en un soporte se añade la muestra diluida y se mide la intensidad tras un tratamiento de datos de la imagen obtenida y por interpolación en la recta de calibrado se cuantifica la cantidad de PT en vino.

A continuación, se muestran las fases a seguir, **Figura 10**, para obtener las medidas con NPCe.

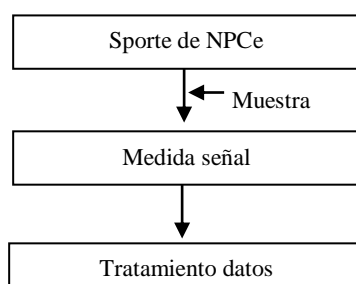


Figura 10. Diagrama de flujo del sensor de NPCe

Las ventajas que tiene este método es que es un método rápido, barato y sólo requiere de instrumental de oficina como ordenador y escáner, con mínima preparación de la muestra.

Las diferencias que se observan con el método de Folin – Ciocalteu vienen recogidas en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Diferencias entre Folin – Ciocalteu y NPCe. Fuente: Sharpe et al., 2013.

Método	Folin – Ciocalteu	Sensor NPCe
Principio de funcionamiento	Reducción de fosfomolibdico para formar complejos azules.	Reducción del Cerio (donación de electrón y formación del complejo de transferencia de carga).
Instrumentos requeridos	Espectrofotómetro UV VIS.	Filtro, óxido de Cerio, escáner, Totallab o Photoshop.
Pasos, tiempo	7 pasos aprox 2 h	1 paso, < 10 min
Rango lineal	0 – 2 mM	0,2 – 2 mM
Condiciones	No específico para fenoles (puede haber interferencias)	Poca muestra, dilución.
Aplicación	Determinación de polifenoles totales en vino y extractos.	Capacidad antioxidante, identificación de antioxidantes, IPT.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1 Objetivos

Ante la necesidad de disponer de técnicas rápidas y sencillas en las bodegas, se ha desarrollado un nuevo sistema de trabajo para determinar polifenoles totales en vino.

Para cuantificar polifenoles totales en vinos, se pretende desarrollar un método basado en el empleo de Nanopartículas de Cerio (NPCe) inmovilizadas sobre una superficie de celulosa. Las Nanopartículas de Cerio IV se reducen a Cerio III en presencia de polifenoles que se traduce en un cambio de color amarillo a marrón que puede ser observado a simple vista. En la caracterización del método se determinará sensibilidad, límite de detección, cuantificación, precisión y exactitud, comparándolo con el método de referencia, Folin – Ciolcateu.

2.2 Plan de trabajo

A continuación, se expone el plan de trabajo seguido durante la realización del sensor de NPCe.

- Revisión bibliográfica de trabajos realizados con Nanopartículas de Cerio.
- Preparación del sensor de Nanopartículas de Cerio, y optimización de sus parámetros utilizando patrones de ácido gálico y catequina.
- Estudio del sistema de integración de la intensidad de cada señal mediante un programa de análisis y conversión de la resolución a unidades de concentración.
- Análisis de resultados y comparación con el método de referencia.
- Propuesta de protocolo del nuevo sensor con Nanopartículas de Cerio
- Aplicación del sensor de Naopartículas de Cerio desarrollado a muestras de vinos comerciales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Sensor

3.1.1 Reactivos

Para preparar el sensor se utilizaron las Nanopartículas de óxido de Cerio (IV) (Sigma - Aldrich, Alemania), al 20 % en H₂O en dispersión coloidal de 0,01-0,02, µm diluidas convenientemente con agua desionizada.

Se ensayaron diferentes soportes de impregnación (**Tabla 4**): papel de filtro Whatman (porosidad media, con un diámetro de 7,1 cm), papel de filtro de laboratorio (RM, porosidad media, con un diámetro de 7,1 cm), nitrocelulosa con diferente tamaño de poro (Millipote, Billerica, MA, USA) y papel de algodón (Arches, Arches, Francia).

Tabla 4. Características filtros empleados. Fuente: proveedores.

Nombre	Referencia	Gramaje (g/m ²)	Porosidad (mm)	Tipo	Velocidad filtración (s/100 mL)
1. Filtro Whatman	1001-070	88	70	Cualitativo	120
2. Resma papel filtro laboratorio	RM13054252	73		Cualitativo	
3. Nitrocelulosa					
90	HF09002XSS	8.09g	181		94
135	HF13502XSS	8.35g	177		137
180	HF18002XSS	9.04g	188		168
4. Papel de algodón	Arches	185	Grano fino		

3.1.2 Tamaño de los filtros

Para adecuar el filtro de laboratorio (RM), la nitrocelulosa y el papel de algodón a las pruebas que se van a efectuar, se recortan en discos de 7,1 cm de diámetro. El papel filtro Whatman no precisa este paso ya que vienen preparados en este formato.

3.1.3 Impregnación del soporte con NPCe

La elaboración del sensor con NPCe se llevó a cabo sumergiendo el soporte en 2 mL de disolución de CeO₂ durante 4 minutos, tras los cuales se extrae y se deja secar durante cinco minutos a 100 °C. Una vez secos los soportes se guardan en desecador hasta su momento de uso. Las concentraciones de NPCe ensayadas fueron de 0,4; 1,0; 4,0; 10 y 20 % preparadas por dilución en agua desionizada a partir del reactivo comercial.

3.1.4 Formatos de aplicación de la muestra

Tras impregnar el papel de filtro con NPCe al 4% se procedió a establecer el formato de aplicación de la muestra sobre el mismo (**Figura 11**). Un formato utilizado fue depositar directamente sobre el soporte gotas de 2,5 μ L de ácido gálico. En el segundo formato se cortó papel de filtro (previamente impregnado con NPCe al 4%) en discos de 0,5 cm y se introdujo cada disco en una alícuota conteniendo ácido gálico.

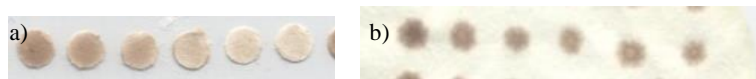


Figura 11. Formatos de aplicación de muestras, a) discos sumergidos en disoluciones patrón, b) formato de aplicación filtro impregnado con NPCe y gotas de patrones.

3.1.5 Procedimiento

Tras la adición de la muestra y secado, se obtuvo una imagen del soporte a 600 puntos por pulgada utilizando un escáner convencional (Epson Versión 6.1; compilación 7601: Service pack: 1, 2009, Japón) y guardada como imagen JPEG, que posteriormente se analizó (TotalLab TL120 V2008, Newcastle, UK).

3.1.6 Riesgos

Las NPCe han sido investigadas por su potencial terapéutico, aunque su toxicidad está bajo evaluación (Sharpe et al., 2015). El uso generalizado de estas nanopartículas para industria e investigación es relativamente nuevo en las últimas décadas, dejando los efectos de exposición s NPCe a largo plazo desconocidos. Como medida de protección se requiere el uso de gafas, guantes y batas de laboratorio durante todo el experimento, aunque no es necesario el uso de mascarilla porque se trabaja en disolución acuosa. En cuanto a posibles riesgos que puede ocasionar a nivel de contacto piel con la solución, puede irritarla por lo que se debe lavar la zona afectada con abundante agua y jabón.

3.2 Folin - Ciocalteu

El método de referencia utilizado es el método oficial, Folin – Ciocalteu, expresando el contenido en polifenoles como equivalentes de ácido gálico (GAE) o de catequina (CE).

3.2.1 Reactivos

En los ensayos con este método se empleó el reactivo de Folin – Ciocalteu (Scharlau, Scharlab S.L., España), carbonato sódico (Scharam Chemie, Barcelona, España) anhidro en disolución al 10%, ácido gálico (Sigma - Aldrich, Chemie GmbH, USA) y catequina (Cymit Química S.L. Barcelona, España).

3.2.2 Preparación de los patrones de calibración

Para realizar la disolución patrón se ha pesado 0,5 g de ácido gálico o catequina y se disolvió adecuadamente con agua destilada.

3.2.3 Procedimiento

El intervalo de trabajo de absorbancia para las muestras de vino ha de estar entre 0,2 y 1,2 ya que valores superiores saturan el espectrofotómetro. Si se obtienen valores de absorbancia superiores se debe realizar una dilución mayor de la muestra o cambiar la cubeta a un paso óptico más pequeño. Para la determinación del blanco o testigo se procede del mismo modo, pero en lugar del vino diluido se adiciona agua destilada.

En este trabajo, las muestras de vino tinto se diluyeron en una proporción 1:25 y las de vino blanco y rosado 1:5 (en agua destilada). Seguidamente, en tubos de ensayo de 10 mL, se introdujeron en el siguiente orden, 250 µL de vino diluido, 250 µL del reactivo de Folin – Ciocalteu y 1250 µL de H₂O. Tras esperar 5 minutos, se añadieron 1000 µL de carbonato de sodio acuoso al 20 % y 2200 µL de agua destilada. Finalmente se agitaron los tubos y se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos en oscuridad. La detección se realizó a 750 nm con un espectrofotómetro (UNICAM 8625 UV/VIS Spectrofotometer) empleando una cubeta de cuarzo de 1cm de paso óptico.

3.2.4 Riesgos

Debemos considerar algunas precauciones en la utilización del reactivo de Folin – Ciocalteu (F-C) ya que es un producto corrosivo por lo se hace necesario el uso de protección como gafas y guantes durante todo el experimento.

3.3 Parámetros de calidad

3.3.1 Límite de linealidad

El límite de linealidad define el valor máximo para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito (Skoog et al., 2005), por lo que en este trabajo se determinó como la concentración máxima que permitió un ajuste lineal con un coeficiente de regresión superior a 0,9.

3.3.2 Límite de detección

El límite de detección se define como la mínima concentración del analito en una muestra que se puede detectar con fiabilidad en un proceso analítico determinado. Este parámetro se obtiene a partir de varias medidas del blanco, calculando su valor medio (Y_b) y la desviación estándar (S_b) según la ecuación $LD = Y_b + 3S_b$, y transformándolo a concentración utilizando la recta de calibrado.

3.3.3 Límite de cualificación

Se define límite de cuantificación como la magnitud mínima que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión. Para calcularlo, se determina el promedio del analito que proporciona una señal igual a la del blanco (Y_b) más diez veces la desviación estándar (S_b) $LQ = Y_b + 10 S_b$, y a partir de este valor se transforma a concentración utilizando la recta de calibrado.

3.3.4 Intervalo de trabajo

Es el intervalo que se utilizará en el trabajo rutinario. Las muestras estarán dentro de los límites de éste y debe ser menor al intervalo lineal, por ello quedará definido entre el límite de cuantificación y el límite de linealidad.

3.3.5 Sensibilidad

La sensibilidad, o sensibilidad de calibración se entiende como la pendiente de la curva de calibrado (m , **Figura 12**). Ésta nos indica la capacidad de un método para discriminar entre dos concentraciones muy próximas por lo que cuanto mayor sea la pendiente, más sensible será el método, como se muestra en la **Figura 12**. Si la curva de calibrado es lineal, la sensibilidad es constante e independiente de la concentración.

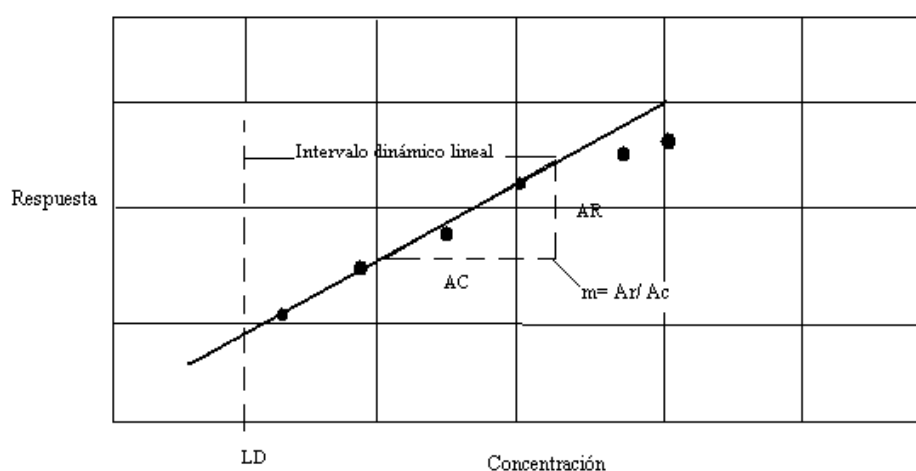


Figura 12. Curva de calibrado de respuesta en función de la concentración de analito.

3.3.6 Método de adiciones múltiples

Normalmente las muestras a analizar se comparan con patrones. En teoría, estos patrones de calibración deben aproximarse a la composición de las muestras que se analizan, no solo con respecto a la concentración del analito sino también en relación con las concentraciones de otras especies en la matriz de la muestra, con el fin de minimizar los efectos de los diversos componentes de las muestras en la medida realizada (Skoog, 2005).

Dado que el efecto matriz es el efecto de todos los componentes de la muestra distintos al analito, a la hora de aplicar un método analítico se traduce en una diferencia de sensibilidad del mismo, cuando se prepara un calibrado en un disolvente frente a uno preparado en el mismo entorno de la muestra. La diferencia entre las pendientes de calibrado en un disolvente determinado (calibrado externo) y en la matriz de la muestra (ya sea simulada o mediante el método de adición patrón), indica la presencia de efecto matriz.

Para evitar el efecto matriz se realiza el método de adiciones múltiples que consiste en añadirle a varias alícuotas de muestra una cantidad conocida de una disolución estándar de analito para obtener la denominada recta de calibrado de adiciones múltiples.

Una desventaja del método de adiciones múltiples es que requiere tiempo extra para hacer las adiciones y las medidas. El beneficio principal es la compensación de los efectos de interferencia desconocidos.

En esta metodología, y para cada muestra se construye una recta de calibrado y se calcula la concentración de polifenol como el valor absoluto de x que corresponde al punto de corte con el eje x. En este trabajo, se tomaron 4 alícuotas de 0,1 mL de vino diluido convenientemente y, sobre ellas se adicionó ácido gálico, con 4 repeticiones sobre el sensor y se cuantificó la señal.

3.4 Muestras de vino

Una vez desarrollado y optimizado el método a partir de patrones de ácido gálico, se aplicó este a muestras comerciales de vino blanco, rosado y tinto. La **Tabla 5** recoge la información de cada muestra.

Tabla 5. Muestras reales procedentes de diferentes bodegas analizadas.

Nº	Tipo vino	Bodega	Variedades	Año	Características principales
1	Tinto	Casón histórico		2016	Vino de mesa
2	Blanco	Casón histórico		2016	Vino de mesa
3	Tinto	UPV	Monastrell, Cabernet Sauvignon y Tempranillo	2016	Vino de crianza, roble francés .
4	Tinto	UPV	Monastrell, Cabernet Sauvignon y Tempranillo	2016	Vino de crianza, roble americano
5	Blanco	UPV	Tardana	2016	Vino joven
6	Rosado	UPV	Bobal	2016	Vino joven
7	Tinto	Villar del Arzobispo	Tempranillo	2015	Radio boca
8	Tinto	Villar del Arzobispo	Tempranillo	2014	Radio boca
9	Tinto	Villar del Arzobispo	Tempranillo, Garnacha	2015	Cerro gordo
10	Tinto	Villar del Arzobispo	Tempranillo	2015	Laderas, joven
11	Tinto	Villar del Arzobispo	Tempranillo, Garnacha	2015	Cerro gordo, crianza
12	Tinto	Villar del Arzobispo	Tempranillo	2014	Laderas. Joven
13	Tinto	Villar del Arzobispo	Tempranillo, Garnacha	2014	Señorío Don Pedro de la Vega, Reserva. 9 meses barrica francesa y 9 meses americana
14	Tinto	Villar del Arzobispo	Tempranillo, Garnacha	2013	Viña Nora, Crianza. 8 meses barrica nueva, 12 meses en botella
15	Tinto	Villar del Arzobispo	Tempranillo	2014	Laderas, joven
16	Tinto	Villar del Arzobispo	Tempranillo		Las Villas, Sangría
17	Tinto	Villar del Arzobispo	Tempranillo, Merlot	2015	L' Antigón, Tinto joven
18	Tinto	Villar del Arzobispo	Merlot	2015	Cantales, 3 meses en barrica americana
19	Blanco	Villar del Arzobispo	Airen	2014	Vino cocina
20	Blanco	Villar del Arzobispo	Semillón	2014	Cantales, blanco joven
21	Blanco	Villar del Arzobispo	Macabeo, Merseguera	2015	Cerro Gordo, blanco joven
22	Blanco	Villar del Arzobispo	Moscatel	2014	Moscatel
23	Blanco	Villar del Arzobispo	Merseguera, Macabeo	2015	Las Villas, blanco joven
24	Blanco	Villar del Arzobispo	Semillón	2014	Cantales, joven
25	Blanco	Villar del Arzobispo	Merseguera, Macabeo	2015	Cerro Gordo, semidulce
26	Blanco	Villar del Arzobispo	Macabeo, Merseguera	2015	Cerro Gordo, joven
27	Blanco	Villar del Arzobispo	Merseguera, Macabeo	2015	L' Antigón, joven
28	Blanco	Villar del Arzobispo	Merseguera, Macabeo	2015	Laderas, joven
29	Blanco	Villar del Arzobispo	Moscatel, Macabeo, Viura	2014	Novios perfectos, semidulce

30	Blanco	Villar del Arzobispo	PX	2014	PX
31	Blanco	Villar del Arzobispo	Semillon	2015	Cantales, joven
32	Blanco	Villar del Arzobispo	-	2014	Vino cocina
33	Blanco	Villar del Arzobispo	Merseguera, Macabeo		Laderas, joven
34	Rosado	Villar del Arzobispo	Garnacha, Bobal	2015	Cerro Gordo, Rosado joven
35	Rosado	Villar del Arzobispo	Tempranillo y Bobal	2015	L' Antigón Rosado, joven
36	Rosado	Villar del Arzobispo	Garnacha y Bobal	2014	Las Villas, Rosado, joven
37	Rosado	Villar del Arzobispo	Tempranillo y Bobal	2014	L' Antigón Rosado, joven
38	Rosado	Villar del Arzobispo	Bobal y Tempranillo	2014	Señorío Don Pedro de la Vega, joven

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Impregnación del soporte con NPCe

Antes de analizar el contenido en polifenoles con el sensor, se ha optimizado la concentración de NPCe con la que se impregnará el soporte de celulosa. Para ello se sumergen los soportes en disoluciones al 0,4; 1; 4; 10 y 20 % de Cerio durante 4 minutos. Posteriormente se secan a 100 °C y se guardan en desecador hasta su uso. Finalmente se añade ácido gálico a diferentes concentraciones. Este experimento se realizó por duplicado.

Una vez obtenido los resultados, la elección de la concentración de Cerio se desarrolló en tres etapas. En la primera etapa se estudiaron los datos en su conjunto, representándose las curvas obtenidas en el intervalo de 1-10 mM. Los resultados en la **Figura 13** indican que la señal es dependiente de la concentración de NPCe, y descende con la concentración, observándose que el mejor ajuste correspondía a una curva logarítmico – normal.

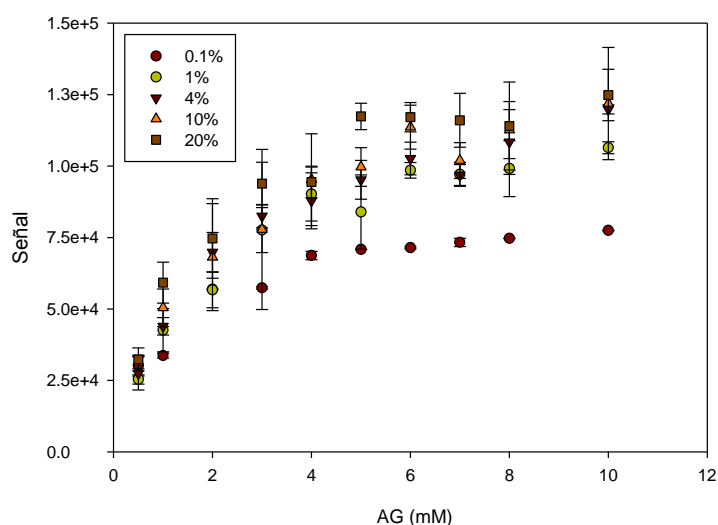


Figura 13. Señal obtenida para soportes con diferente cantidad de CeO₂.

En la segunda etapa, dado que la relación señal concentración era logarítmico – normal típica de una curva de saturación, se estudió un intervalo de trabajo menor para ver si presentaba un comportamiento lineal aceptable. En la **Tabla 6** se puede apreciar que a bajas concentraciones se observa un buen ajuste, con coeficiente de correlación superior a 0,9 para todas las concentraciones de Cerio. Se ha elegido la concentración de NPCe al 4 % porque la relación entre señal y concentración de AG presenta mayor coeficiente de correlación. Además, se consume menos reactivo.

Tabla 6. Ecuaciones de los soportes con diferente cantidad de NPCe.

Método	Ecuación
0,4% NPCe	$y = 3,3636 \text{ Ln}(x) \cdot 10^4 + 8.1826 \cdot 10^4; R^2 = 0,948$
1% NPCe	$y = 5,5878 \text{ Ln}(x) \cdot 10^4 + 8.7272 \cdot 10^4; R^2 = 0,975$
4% NPCe	$y = 5,9532 \text{ Ln}(x) \cdot 10^4 + 9.4229 \cdot 10^4; R^2 = 0,985$
10% NPCe	$y = 6,0686 \text{ Ln}(x) \cdot 10^4 + 10.043 \cdot 10^4; R^2 = 0,975$
20% NPCe	$y = 6,1932 \text{ Ln}(x) \cdot 10^4 + 11.316 \cdot 10^4; R^2 = 0,968$

En la tercera etapa se estudió la bondad de un ajuste lineal en el intervalo de 0-3 mM. En todos los casos, y a bajas concentraciones (hasta 3 mM), se observa un comportamiento lineal (**Figura 14**).

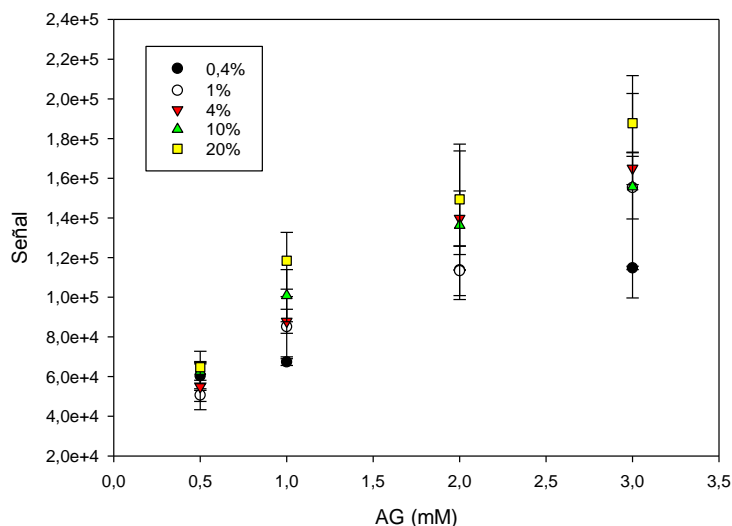


Figura 14. Señal obtenida para soportes con diferente cantidad de NPCe.

El soporte impregnado con 0,4 % presenta la mayor sensibilidad, pero el coeficiente de correlación más alto, corresponde a la concentración de 4% de NPCe (**Tabla 7**). Le siguen la del 20; 10; 4 % y por último la del 1%. Por ello, se elige la cantidad de NPCe al 4% para realizar el sensor, descartando los restantes.

Tabla 7. Ecuaciones de las rectas de calibrado

Método	Ecuación
0,4% Cerio	$y = 4,539 \cdot 10^4 x + 5,6295 \cdot 10^4; R^2 = 0,937$
1% Cerio	$y = 2,829 \cdot 10^4 x + 4,5701 \cdot 10^4; R^2 = 0,928$
4% Cerio	$y = 3,953 \cdot 10^4 x + 3,6841 \cdot 10^4; R^2 = 0,979$
10% Cerio	$y = 4,411 \cdot 10^4 x + 4,0201 \cdot 10^4; R^2 = 0,966$
20% Cerio	$y = 3,572 \cdot 10^4 x + 5,5815 \cdot 10^4; R^2 = 0,932$

4.2 Cantidad de muestra

Para optimizar el volumen de muestra o patrón a añadir sobre el soporte una vez impregnado con NPCe, se probaron varios volúmenes 1; 1,5; 2 y 2,5 μL . Las gotas entre 1 y 2 μL eran gotas de pequeño tamaño originando una gran variabilidad en los resultados; mientras que 2,5 μL eran más grandes y se podía analizar mejor. Por ello, se optó por el tamaño de gota de 2,5 μL , que coincide con el valor utilizado en la bibliografía (Sharpe et al, 2013 y 2015).

4.3 Tipos de soporte

Se han estudiado distintos materiales para utilizar como soportes, descritos en materiales y métodos, apartado 3.1.1, impregnándolos todos ellos con una disolución NPCe al 4 %.

El papel de algodón es un papel muy absorbente pero al sumergirlo en la dilución de NPCe al 4 % se ha observado que las fibras del papel perdían su estructura tridimensional. Además, al añadir las gotas de muestra, éstas se dispersaron por todo el papel (**Figura 15**), por lo que este soporte se ha descartado.

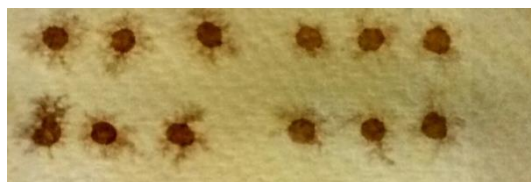


Figura 15. Papel de algodón.

La nitrocelulosa se ha descartado ya que la impregnación con NPCe es muy lenta y además al depositar las gotas no se absorbían con facilidad produciéndose su dispersión y unión con las gotas vecinas ante cualquier movimiento del sensor (**Figura 16**). Estos problemas eran debidos a la baja permeabilidad del material relacionado con su pequeño tamaño de poro.



Figura 16. Nitrocelulosa con impregnada con NPCe en las que se han depositado gotas con ácido gálico.

Los dos papeles de filtro utilizados (Whatman y RM) no presentaron problemas de estabilidad en su estructura ni de absorción de la muestra, aunque el papel de filtro Whatman presenta un mejor ajuste (**Figura 17**), por lo que se decidió elegir el papel Whatman como material de soporte para impregnar con la disolución de NPCe al 4 %.

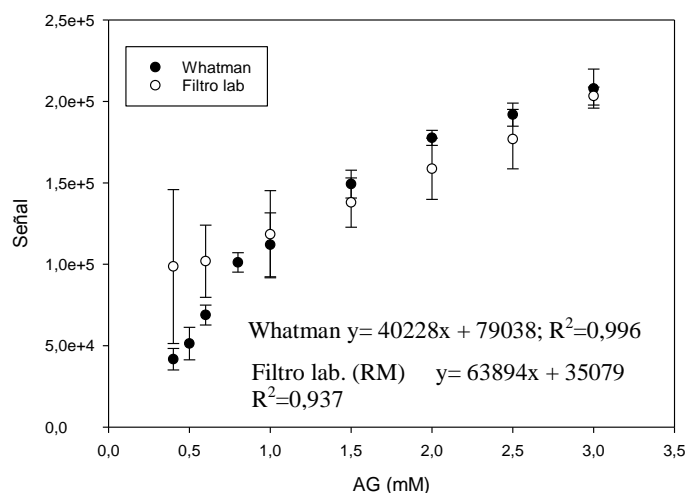


Figura 17. Comparación papel filtro Whatman y RM.

4.4 Estabilidad del complejo coloreado

También se analizó la estabilidad del complejo coloreado Ce (III) – AG. Para prepararlo, sobre el filtro impregnado con Cerio, se añadieron diferentes concentraciones de AG (0.078 a 10 mM) y se dejó secar en estufa a 160 °C. Tras 48h el color habido desapareció concluyéndose que el complejo coloreado Ce (III) – AG no era estable al calor.

Se realizó una segunda prueba sumergiendo el filtro por completo en una caja Petri, la cual tenía una cantidad suficiente de AG para impregnar el filtro. La concentración que se empleó para sumergir el disco fue de 10 mM. Tras un minuto en la caja Petri se retiró, se llevó al horno para secarlo, y se dejó tres días en la estufa a 150 °C. El resultado obtenido manifestó también que el complejo coloreado impregnado completamente no es estable a altas temperaturas, **Figura 18**. Estos resultados

preliminares parecen indicar que el ensayo podría reutilizarse, tras regenerar el sensor a 150 °C. Aunque no es objeto de estudio en este trabajo.

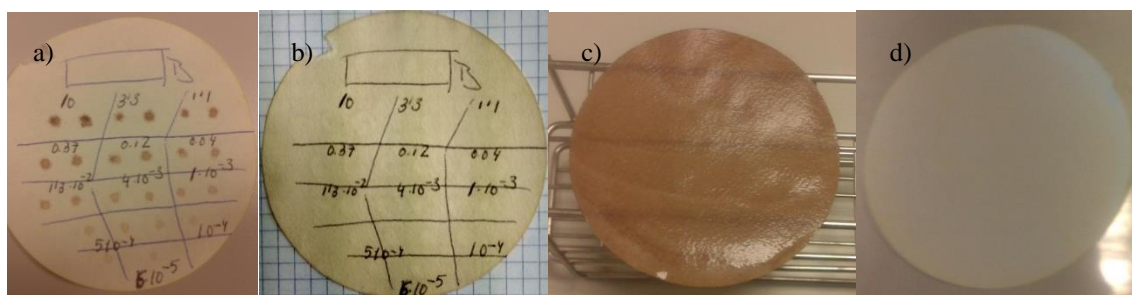


Figura 18. a) Filtro con gotas de diferentes concentraciones de AG b) filtro tras ser secado en la estufa c) filtro tras ser sumergido completamente en disolución patrón d) filtro al ser secado en la estufa.

4.5 Formatos de aplicación de la muestra

Se estudiaron los dos formatos descritos en material y métodos: el primero, pequeños discos de papel de filtro de 0,5 cm de diámetro impregnados previamente con NPCe 4% que se sumergieron en la muestra y el segundo, la deposición de diferentes gotas de muestra sobre el soporte. Las concentraciones de los patrones utilizados abarcaron un intervalo de 0 – 3,0 mM de ácido gálico realizándose 5 repeticiones de cada una en ambos formatos, **Figuras 19 y 20** respectivamente.

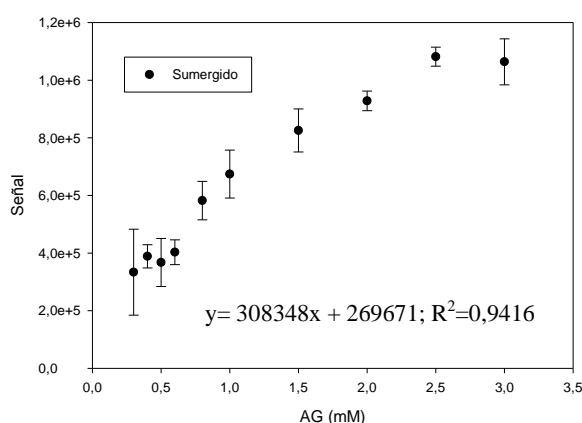


Figura 19. Ajuste lineal de los resultados obtenidos por inmersión del disco con NPCe 4%.

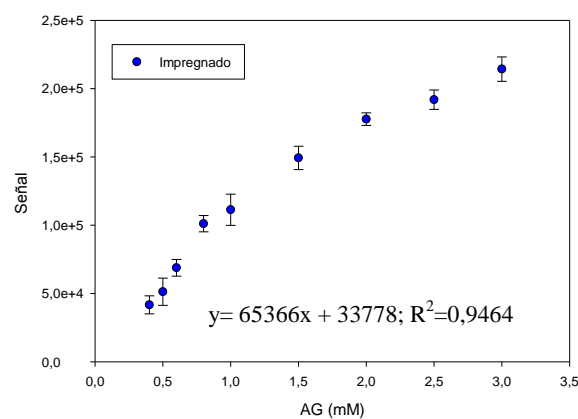


Figura 20. Ajuste lineal de los resultados obtenidos con el formato de deposición de gotas sobre el soporte impregnado con NPCe 4%..

Los resultados indican que el método de sumergir el disco con un diámetro de 0,5 cm en la disolución de ácido gálico tiene una mayor sensibilidad. Además, este método permite que el filtro se impregne completamente y la medida sea más eficaz que simplemente añadiendo una cantidad determinada de polifenol al filtro. El segundo método, en el que se adiciona un volumen de gota de 2,5 uL de patrón de AG al filtro tiene menor sensibilidad. Sin embargo, se ha observado que el método obtenido por inmersión en AG tiene una mayor variabilidad, por ello se ha elegido el segundo método, que consiste en la adición de gotas de muestra sobre el sensor, aunque el primero resulta una vía interesante para futuros estudios.

4.6 Respuesta del sensor frente a catequina

El sensor de NPCe también se ha aplicado a la cuantificación de catequina patrón. Este polifenol no tiene un comportamiento lineal como con el ácido gálico ($R^2 = 0,791$, **Figura 21**), sino que sigue una tendencia logarítmica, por lo que se decidió trabajar sólo con ácido gálico como patrón.

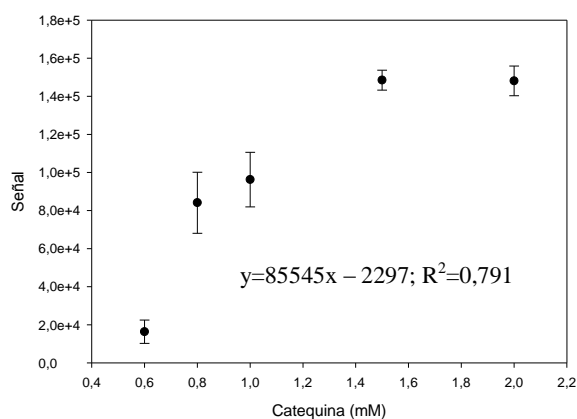


Figura 21. Recta de calibrado de la catequina sobre el sensor de NPCe.

4.7 Caracterización del método oficial

Para evaluar la calidad del método desarrollado se comparó con el método oficial Folin – Ciocalteu, caracterizado previamente. Para ello se realizaron medidas por quintuplicado en dos semanas distintas. En la **Figura 22** se observa un ajuste lineal de los datos obtenidos coincidiendo con los resultados publicados en la bibliografía (Stratil et al., 2006, Lei et al., 2012) con un ajuste excelente.

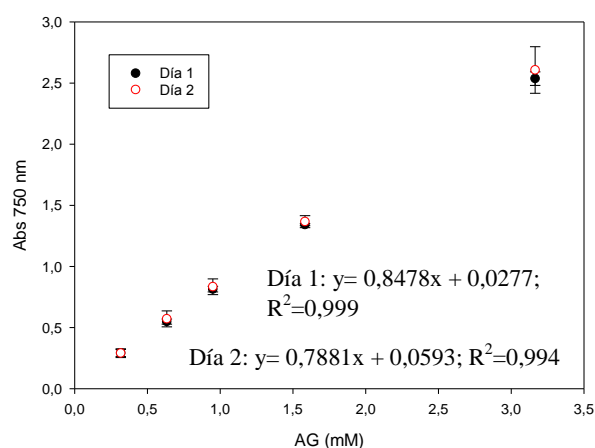


Figura 22. Recta calibrado de ácido gálico determinado por Folin – Ciocalteu (n=3) realizada en dos días diferentes.

Además, se puede observar que prácticamente no hay diferencias entre los resultados de Folin – Ciocalteu de un día y el otro.

4.8 Comparación de métodos

Para evaluar la aplicabilidad del sensor de NPCe se procedió a comparar las características analíticas del mismo con el de referencia utilizando ácido gálico como patrón, por ello se ha calculado el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) a partir de sus rectas de calibrado (**Figura 23**). Con ello se estimó la precisión y la exactitud de ambos métodos con el fin de evaluar la aplicabilidad del sensor de NPCe. Los valores de estos parámetros se recogen en la **Tabla 8**.

Ambos métodos presentan un ajuste lineal, con un R superior a 0,95. Una vez realizadas medidas de múltiples blancos, se obtuvo un límite de detección 0,10 mM de ácido gálico; superior al del método oficial, pero suficiente para que este sensor se pueda utilizar como método rápido de análisis.

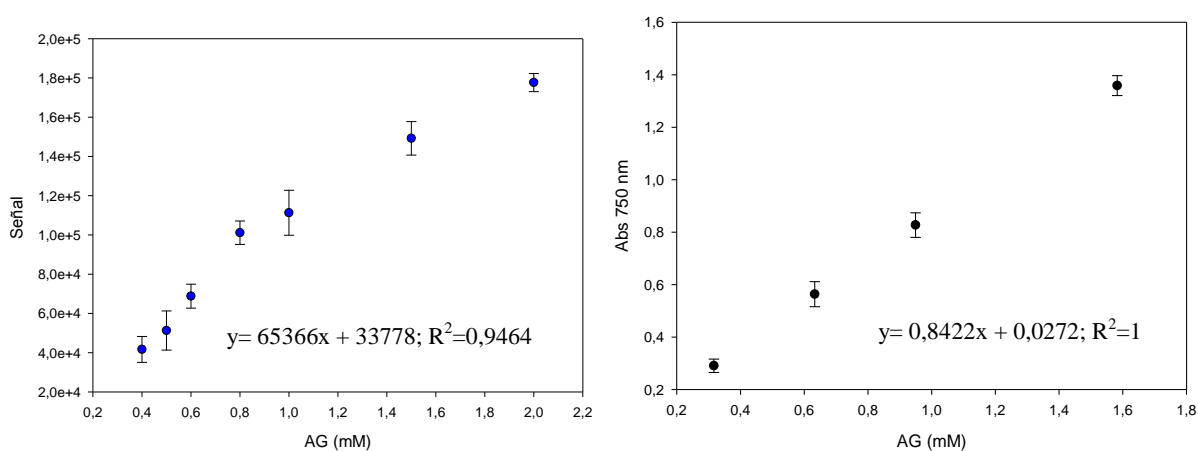


Figura 23. Comparación señal NPCe y método oficial.

Tabla 8. Resultados obtenidos al analizar AG mediante el uso de Nanopartículas de Cerio (NPCe) n=10 y el método de referencia Folin – Ciocalteu (F-C) n=10 blancos

	NPCe	F-C
LD (mM)	0,10	0,0005
LC (mM)	0,25	0,011

4.9 Comprobación del método sobre muestras reales

Con el fin de estudiar la exactitud del método se procedió a determinar el contenido en ácido gálico (GAE) de dos muestras de vino mediante el sensor de NPCe y comparar el resultado obtenido con el método oficial.

Los datos obtenidos con el sensor de NPCe realizado con tinto (muestra 1, **Tabla 5**) ha dado un valor de $1,0 \pm 0,3$ mM de equivalentes de ácido gálico. En el caso del vino blanco (muestra 2, **Tabla 5**) la concentración obtenida de ácido gálico ha sido $0,5 \pm 0,2$.

Con el método oficial, la concentración determinada ha sido $8,5 \pm 1,7$ mM para el tinto y $1,3 \pm 0,6$ mM para el blanco (**Tabla 9**).

Tabla 9. Comparación de resultados obtenidos con F-C y NPCe con ecuación lineal.

Muestra	GAE (mM)	
	F-C	NPCe
M1 (tinto)	8,5 ± 1,7	1,0 ± 0,3
M2 (blanco)	1,3 ± 0,6	0,5 ± 0,2

Las concentraciones obtenidas con el sensor NPCe son menores que con el método oficial. La gran diferencia entre los resultados obtenidos con el sensor de NPCe y el método de referencia, hace pensar en la presencia de un efecto matriz importante que, de algún modo, afecta al resultado.

4.10 Determinación de polifenoles totales con NPCe utilizando el método de adiciones múltiples de AG

Para minimizar el efecto matriz se ha recurrido al método de las adiciones múltiples de patrón aplicado a los vinos anteriores (un blanco y un tinto).

Se agregó ácido gálico a 100 μ L de vino tinto y blanco (diluidos convenientemente) con el fin de obtener unas concentraciones finales de ácido gálico añadido de 1,0; 0,5; 0,25 y 0 mM. De cada una de estas disoluciones se cogieron 2,5 μ L y se depositaron sobre el sensor de NPCe. Tras dejarlo secar se analizó obteniendo los siguientes resultados (**Figura 24**).

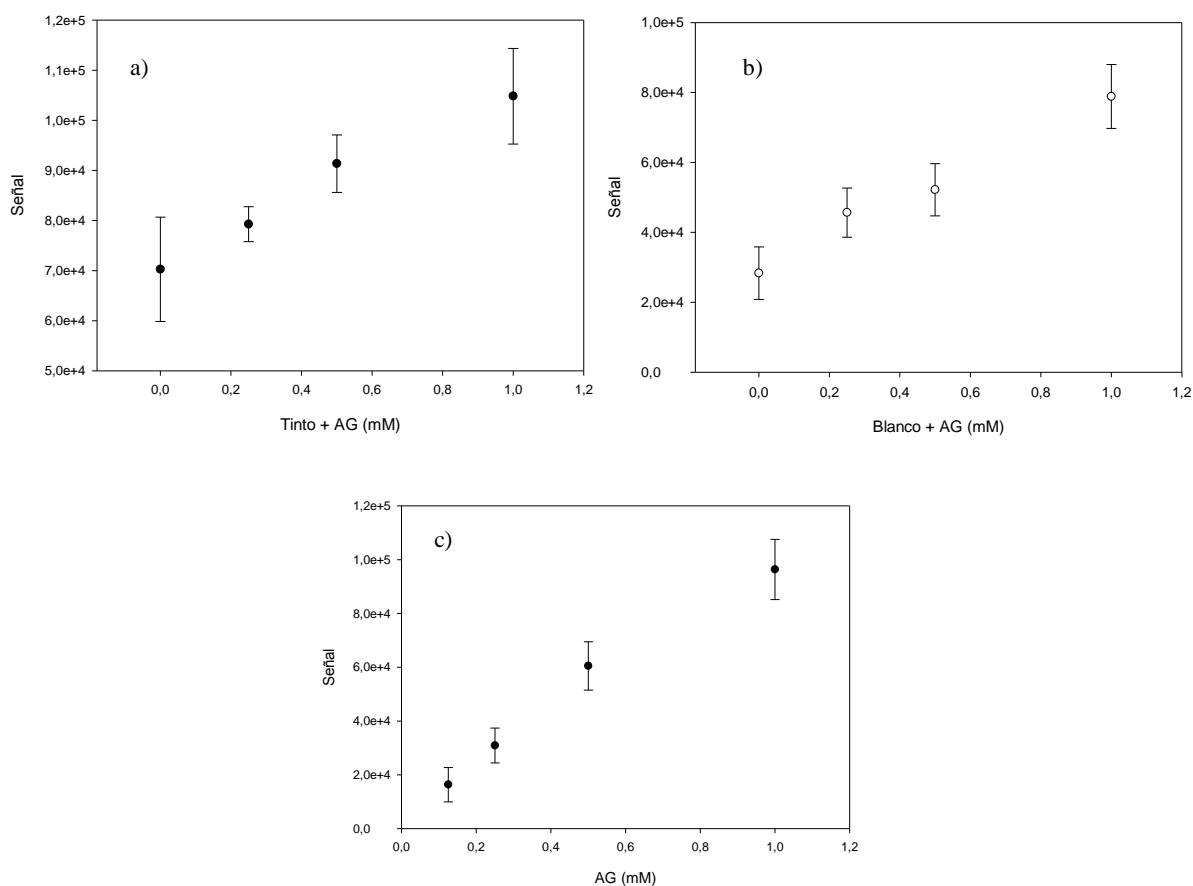


Figura 24. Rectas de calibrados con adición de patrón de ácido gálico sobre vino tinto (a) y blanco (b). Recta de calibrado del con ácido gálico (c). n° de repeticiones, n=10

Se encuentra que la adición múltiple realizada en el tinto ha hecho que la pendiente disminuyera pero el resultado obtenido se asemeja mucho más al método oficial. Además, no es necesario realizar la recta de calibrado porque está incluida.

El mismo experimento se ha realizado con Folin – Ciocalteu. La comparación entre ambos métodos vienen recogidos en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Resultados de F – C y NPCe en vino Tinto y Blanco (Mercadona)

	F – C (mM, GAE)	NPCe adic. Mult. (mM, GAE)
M1 (tinto)	9,8 ± 1,0	10 ± 2
M2 (blanco)	2,1 ± 0,5	3,1 ± 1,4

Se observa que la dispersión de los resultados obtenidos mediante el sensor de NPCe es más elevada que para el método de referencia. La mayor variabilidad en los resultados es una característica común en las técnicas rápidas que se ve compensada por la rapidez en los resultados y su bajo coste, sobre todo en cuanto a inversión en instrumental.

No obstante, se puede observar que los datos con adición de patrón son del mismo orden que con el método de Folin – Ciocalteu. De hecho, tras realizar el Análisis de Varianza con estas dos muestras, no se han encontrado diferencias significativas entre las medias de GAE obtenidas con el método de Folin – Ciocalteu y las realizadas con el sensor de NPCe con adiciones múltiples.

4.11 Propuesta de protocolo de uso del NPCe

A la vista del trabajo realizado se propone el siguiente protocolo para el sensor con NPCe.

En primer lugar, se realizan las diluciones de la muestra necesarias. Si el vino es blanco, se diluye 1/5 y si es tinto se diluye 1/25, obteniendo un volumen final de 5 mL para poder realizar suficientes repeticiones.

En el segundo paso se toman 4 alícuotas de 100 µL de vino (diluido convenientemente) y a cada alícuota se le agrega ácido gálico para obtener concentraciones finales de ácido gálico añadido de 1,5; 1,0; 0,5 y 0 mM. Seguidamente se depositan 2,5 µL de muestra sobre el sensor de NPCe y por último se realiza la lectura e interpretación de los resultados.

A modo de ejemplo, se han analizado varias muestras de vino. Dos tintos (M3 y M4), un blanco (M5) y un rosado (M6) todos ellos procedentes de la bodega de Universitat Politècnica de València como se detalla en la **Tabla 5** del apartado 3.4. El primer tinto, analizado con una crianza en barrica americana, ha tenido la mitad de concentración de ácido gálico equivalente en comparación con el Folin – Ciocalteu y el segundo tinto, con una crianza en barrica francesa la concentración en ácido gálico equivalente ha sido ligeramente superior al anterior pero inferior al método oficial, tal y como se puede apreciar en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Concentración de GAE en vino tinto, blanco y rosado determinado con NPCe y Folin – Ciocalteu.

GAE								
	M3 (tinto)		M4 (tinto)		M5 (blanco)		M6 (rosado)	
Conc	Señal	SD	Señal	SD	Señal	SD	Señal	SD
0	61913	1731	64557,25	5343	21012,75	2681	42220,5	6798
0,5	92657,25	5138	90140,25	3227	58226	8296	78113,25	7282
1	120085,5	5357	108965,75	5252	84785,25	6869	89176,75	7459
1,5	128403,75	7146	118192,75	3693	103786	11044	106744,25	13838
Conc(Y=0)	7,35		10		2,34		4,36	
Folin – Ciocalteu	15,95		16,92		2,15		2,85	

4.13 Aplicación del método a muestras reales

También se ha realizado el mismo procedimiento sobre muestras procedentes de bodegas El Villar (Villar del Arzobispo). Las muestras se han clasificado en vinos blancos (**Tabla 12**), tintos (**Tabla 13**) y rosados (**Tabla 14**).

Tabla 12. Resultados de la determinación de GAE con Nanopartículas de Cerio y Folin – Ciocalteu en blancos.

BLANCOS		
	NPCe	F-C
Muestra	GAE (mM)	GAE (mM)
7	3,96	1,78
8	5,27	2,05
9	6,36	1,85
10	6,6	2,05
11	5,09	1,25
12	8,55	1,98
13	5,09	2,08
14	6,08	1,87
15	4,25	2,01
16	4,61	2,16
17	6,91	1,55
18	6,2	1,74
19	5,46	2,50
20	4,28	1,66
21	6,08	0,92

Como se puede observar el sensor de Nanopartículas de Cerio genera resultados ligeramente mayores que los obtenidos mediante el método de Folin – Ciocalteu. Al igual pasa con los tintos, y rosados. El método de adiciones múltiples utilizado con el sensor de NPCe logra eliminar las interferencias obteniendo unos resultados diferentes al método oficial, lo que nos hace pensar que es posible que el método de referencia pueda tener interferencias.

Tabla 13. Resultados de la determinación de GAE con Nanopartículas de Cerio y Folin – Ciocalteu en tintos.

TINTOS		
	NPCe	F-C
Muestra	GAE (mM)	GAE (mM)
22	13,38	9,77
23	16,2	8,82
24	12,78	11,85
25	14,97	11,74
26	7,49	13,87
27	16,74	12,54
28	20,93	11,57
29	20,35	10,55
30	19,37	12,17
31	15,68	14,17
32	24,12	10,64
33	14,23	11,98

Tabla 14. Resultados de la determinación de GAE con Nanopartículas de Cerio y Folin – Ciocalteu en rosados.

ROSADOS		
	NPCe	F-C
Muestra	GAE (mM)	GAE (mM)
34	4,72	2,48
35	2,19	2,64
36	5,01	2,76
37	5,5	2,07
38	2,49	1,45

Para comprobar si el método de Folin – Ciocalteu tiene interferencias se han realizado adiciones múltiples de AG sobre distintas alícuotas del mismo vino. Para ello, se han tomado tres muestras al azar de cada tipo de vino y se ha realizado adición de AG hasta concentraciones finales de 0,3; 0,6; 0,9; 1,5 mM de AG. Los resultados se muestran en la **Tabla 15**. Las muestras que se han elegido al azar para el blanco son 10, 13 y 18. En el caso del tinto 27, 30 y 32. En cuanto al rosado 35, 37 y 38.

Tabla 15. Adición de patrón interno a F – C y comparación con F – C.

Blanco				Rosado				Tinto					
FC	FC + AG	Ea	Er	FC	FC + AG	Ea	Er	FC	FC + AG	Ea	Er		
GAE (mM)	GAE (mM)		(%)	GAE (mM)	GAE (mM)		(%)	GAE (mM)	GAE (mM)		(%)		
M13	1,82	2,09	0,27	14,84	M36	3,10	3,30	0,20	6,45	M16	9,88	9,43	-
M10	2,13	2,16	0,03	1,41	M37	3,10	2,71	-	-12,58	M30	9,88	14,80	0,45
M18	2,39	2,7	0,31	12,97	M35	2,80	3,38	0,58	20,71	M32	12,51	13,80	4,92
												1,29	10,31

Como se puede observar el método de referencia tiende a subestimar la concentración de ácido gálico equivalente con diferencias de hasta el 15 % (expresadas como error relativo). Estos resultados son consistentes con los valores obtenidos con el sensor de NPCe aunque es necesario seguir realizando estudios más amplios que abarcaran un mayor número de muestras.

5. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Como conclusiones de los experimentos podemos obtener los siguientes puntos:

1. El sistema propuesto, en el que se usan Nanopartículas de Cerio sobre un soporte sólido, permite obtener el contenido en polifenoles totales, expresados como equivalentes de ácido gálico de una forma rápida y sencilla en muestras de vino.
2. Con este sistema es necesario realizar adiciones múltiples para evitar interferencias en la matriz.
3. Sobre las muestras reales se ha podido determinar la cantidad de polifenoles totales con NPCe obteniendo resultados más altos a los obtenidos con el método oficial.
4. El método oficial también está sujeto a interferencias por lo que el sistema propuesto podría mejorar este inconveniente.
5. Se debe seguir investigando en la optimización del proceso de fabricación del sensor con el fin de mejorar los inconvenientes observados a la hora de cuantificar los polifenoles totales en vinos de forma rápida en la bodega.

6. BIBLIOGRAFÍA

Alasalvar C., Grigor J. M., Zhang D., Quantick P.C., Shahidi F. (2001). Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1410-1416.

Andrei V., Sharpe E., Vasilescu A., Andreescu S. (2016). A single use electrochemical sensor based on biomimetic nanoceria for the detection of wine antioxidants. *Talanta*, 156-157, 112-118.

Apers S., Naessens T., Van De Steen K., Cuyckens F., Claeys M., Pieters L., Vlietinck A. (2004). Fast high performance liquid chromatography method for quality control of soy extracts. *J. of Chrom.* 1038, 107-112.

Asensio G., M^aA. (2000). *Estudio de las modificaciones del Patrimonio Fenólico y color de vinos tintos mediante la utilización de clarificantes*. Trabajo fin de carrera. Universitat Politècnica de València.

Benavent J.L.A., Álvarez C. M^a I. (2003). *Tecnología enológica*, Ed. síntesis, S.A. 1, 19-21.

Blouin J., Gimberteau G. (2012). *Maduración y madurez de la uva*. Ed. Mundi – Prensa, 5, 73.

Bravo L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317-333.

Brouillard R., Dangles O., (1994). Anthocyanin molecular interaction: the first step in the formation of new pigments during wine aging. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 6692- 6704.

Cheyrier V., Moutounet M., Sarni-Manchado P. (2000). *Los compuestos fenólicos*. Fundamentos Científicos y Tecnológicos, 1st ed., Flanzky, C., Ed., AMV Ediciones y Ed. Mundi – Prensa, 114-136.

Chinnici F., Gaiani A., Natali N., Riponi C., Galassi S. (2004). Improved HPLC Determination of phenolic compounds in Cv *golden Delicious Apples* using a Monoli. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 3-7.

De Rosa T. (1988). *Tecnología del vino tinto*. Ed. Mundi – Prensa, Madrid.

García Martínez E., Fernández S. I., Fuentes L. A. (2015) Determinación de polifenoles totales mediante Folin – Ciocalteu. RuiNet, Repositorio UPV, docencia, objetos de aprendizaje, plan docencia en Red, artículos docentes.

Garewall A. S. (1997). *Antioxidants and disease prevention*. Boca Raton FL.

Gruz J., Novak O., Strnad N. (2008). Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC-MS/MS. *Food Chem.*, 111,789-794.

Hernández-Saseta I., Congález-Lázaro L., Guadalupe Z., Ayestarán B., Bueno-Herrera M., González-Huerta C., López de la Cuesta P., Pérez-Magariño S. (2015) Elaboración de los vinos espumosos de calidad a partir de variedades tintas. Efecto de diferentes técnicas vitivinícolas en la composición polifenólica. *Enología 2015, grupos de investigación enológica*, 11, 308-311.

Hmamouchi M., Es-Safi N., Lahrichi M., Fruchier A., Essassi E. M. (1996). Flavones and flavonols in leaves of some Moroccan *Vitis vinifera* cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 186-192.

Ivanova V., Vojnoski B., Stefova M. (2012). Effect of winemaking treatment and wine aging on phenolic content in Vranec wines. *J. Food Sci. Technol.*, 49, 161-172

- Jasenka P., Martínez S., Valek L., Stipcevic T., CovacevicGanic K. (2005). A comparison methods used to define the phenolic content and antioxidant activity of Croatian wines. *Food Technol. Biotechnol.*, 43, 271-276.
- Karakoti A., Singh S., Dowding J. M., Seal S., Self W.T. (2010). Redox-active radical scavenging nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.*, 39, 4422-4432.
- Kerem Z., Bravdo B-A., Shoseyov O., Tugenghaft Y. (2004). Rapid liquid chromatography-ultraviolet determination of organic acids and phenolic compounds in red wine and musts. *J.Chromat. A.*, 1052, 211-215.
- Lei Z., Yali Z., Jiajin D., Huirong L., Jiang L. (2012). Phenolic concentration and antioxidant properties of wines made from North American Grapes Grown in China. *Molecules*, 17, 3304-3323.
- Liazid A., Barbero F. G., Palma M., Brigui J., Barroso C. G. (2010). Rapid determination of simple polyphenols in grapes by LC using a Monolithic column. *Chromatographia*, 72, 417-424.
- Lizama V., Álvarez I., Peidró M.J., Alexandre J.L., Aleixandre-Tudó J.L. (2015). Efecto del tipo de depósito sobre la evolución de los parámetros polifenólicos en vinos tintos. *Enología 2015, grupos de investigación enológica*, 16, 324,327.
- Llobera A. (2004). Obtenció d'antioxidants naturals a partir de subproductes del procés de vinificació del raïm autòcton Manto negro. Conselleria d'Agricultura i Pesca, *Quaderns d'Investigació*, Vol. 1.
- López-Alejandre M.Mª. (2005). *Viticultura, enología y cata para aficionados*. Ed. Mundi – Prensa, 1, 42-44.
- Minussi R.C., Rossi M., Bologna L., Cordí L., Rotilio D., Pastore M. G., Durán N. (2003). Phenolic compounds and total antioxidant potencial of commercial wines. *Food Chem.*, 82, 409-414.
- Monagas M., Suarez R., Gómez-Cordovés C., Bartolomé B. (2005). Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines by HPLC - DAD/ESI-MS. *Am. J. Enol. Vitic.*, 56, 139-147.
- Neuza P., Perestrelo R., Marques J. C., Camara J.S. (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose and white wines. *Food Chem.*, 105, 204-214.
- Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV). (2009). Compendium of international methods of analysis – OIV, Folin – Ciocalteu Index, Method OIV-MA-AS2-10: R2009, 1. Recurso disponible en: <http://www.oiv.int/public/medias/2326/oiv-ma-as2-10.pdf> consultado el día 5 de marzo a las 11:22.
- Revilla E., Carpena O., Mataix J.J. (1985). Leaf polyphenolic composition of two grape vine cultivars (Airen Cencibel) during ripening. *An. Edafol. Agrobiol.*, 44, 787-797.
- Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. (2006). Phenolic compounds. En *Handbook of Enology, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments, 2nd Edition*; John Wiley and Sons Ltd. Ed. Chichester, Vol. 2, 129-186.
- Rupasinghe H. P., Clegg S. (2007). Total antioxidant capacity, total phenolic content, mineral elements, and histamine concentration in wines of different fruit sources. *J. Food Comp. and Analys.* Vol. 20, 133-137.
- Rychecki H. L. H. (1996). *Envejecimiento en botella de vinos tintos varietales de Tempreanillo, Bobal y Monastrell*. Tesis doctoral. Universitat Politècnica de València.

Sharpe E., Silvana A. (2015). Integration of Nanoparticle-Based Paper Sensor into the Classroom: An Example of Application for Rapid Colorimetric Analysis of Antioxidants. *J. Chem. Educ.*, 92, 886-891.

Sharpe E., Frasco T., Andreescu D., Andreescu S. (2013). Portable Ceria Nanoparticle-based assay for rapid detection of food antioxidants (Nano-Cerac). *Analyst*, 2138, 249-262.

Shirley B.W. (1996). Flavonoid biosynthesis: ``new`` functions for an ``old`` pathway. *Trends Plant Sci.*, 1, 377-382.

Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., Crouch S. R. (2005) *Fundamentos de química analítica*. Ed. Thomson, Madrid. Muestreo, estandarización y calibración, 8, 211-215.

Singleton U.L. y Rossi J.A. (1995). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 144-158.

Stevanato R., Fabris S., Momo F. (2004). New Enzymatic Method for the Determination of total Phenolic Content in Tea and Wine. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 6287-6293.

Stratil P., Klejdus B., Kubáň V., (2006). Determination of total content of Phenolic Compounds and their Antioxidant Activity in Vegetables – Evaluation of Spectrophotometric Methods. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 607-616.

Koprino S.A., productos, óxido de cerio, información técnica http://199.237.230.236/movil/productos/oxido_Cerio.html Consultado día 3 de junio a las 10:16.

Valls J., Lampreave M., Nadal M., Arola L. (2000). Importancia de los compuestos fenólicos en la calidad de los vinos tintos de crianza. *Alim. equipos y tec.* 2, 119-124.