

## DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE VINOS MEDIANTE ANÁLISIS DE INYECCIÓN EN FLUJO CON DETECCIÓN AMPEROMÉTRICA

Arlene Soto<sup>(1)</sup>, José A. Rodríguez<sup>(1)\*</sup>, Araceli Castañeda-Ovando<sup>(2)</sup>

- 1) Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Centro de Investigaciones Químicas, Ciudad Universitaria, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5, 42184 Mineral de la Reforma, México. Tel (771) 7172000 Ext. 2217, \*e-mail: jara78@qa.uva.es
- 2) Universidad Politécnica de Francisco I. Madero. Área de Ingeniería Agroindustrial. Carretera Tepatepec-San Juan Tepa, Km. 2. Tepatepec, Hidalgo. C.P. 42660. Tel. y Fax (738)7241170.

### INTRODUCCION

La oxidación es uno de los procesos más importantes en el deterioro de los productos alimenticios. Tiene grandes repercusiones en el color, sabor y textura de los alimentos. Los antioxidantes protegen la calidad de un alimento y previenen su deterioro ocasionado por reacciones oxidativas [1]. En los últimos años, la restricción en el uso de antioxidantes como butilhidroxilanisol (BHA) y bitulhidroxiltolueno (BHT) ha causado un gran interés en el estudio de los antioxidantes naturales presentes en los productos alimenticios.

El vino es rico en compuestos funcionalizados que contienen el grupo catecol, estos compuestos imparten la actividad antioxidante a los vinos. Los antioxidantes contenidos en los alimentos, son en su mayoría, compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides) Entre los flavonoides que tienen un efecto benéfico, propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias, anti-alérgicas, anti-hemorrágicas y anti-cancerígenas, podemos citar el canferol, la cuercitina, la mirecetina y la catequina [2].

Los métodos de determinación de la capacidad antioxidante se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o la muestra. Por otra parte, hay ensayos que se basan en la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo. Los distintos métodos difieren en el agente oxidante, en el sustrato empleado, en la medida del punto final, en la técnica instrumental utilizada y en las posibles interacciones de la muestra con el medio de reacción [3]. De manera uniforme se ha elegido como sustrato el Trolox, determinándose la capacidad antioxidante como  $\text{mg}_{\text{Trolox}} \text{ l}^{-1}$ .

Los métodos analíticos usados comúnmente para llevar a cabo la determinación de antioxidantes naturales y añadidos son lentos, limitados en cuanto a su aplicación, además de que el pretratamiento de la muestra favorece la pérdida de analito. Por esta razón el presente trabajo propone un método de flujo con detección amperométrica útil en la determinación de la capacidad antioxidante en vinos. El sistema debe ser: rápido, con un amplio intervalo de aplicación, que requiere una cantidad mínima de muestra, económico, sencillo y con una velocidad de muestreo elevada que permite analizar una gran cantidad de muestras en poco tiempo.

### EXPERIMENTAL

#### Reactivos y disoluciones

Todas las disoluciones fueron preparadas disolviendo el respectivo reactivo de calidad analítica en agua destilada. Una disolución patrón de  $1.00 \text{ g l}^{-1}$  de Trolox se preparó diariamente disolviendo el reactivo analítico en etanol. Las distintas disoluciones estándar fueron preparadas diariamente mediante dilución de la disolución patrón con agua. Se utilizó una disolución acarreadora compuesta tampón citratos pH 4.5,  $0.5 \text{ mol l}^{-1}$ . Las muestras de vinos (blancos, rosados y tintos) fueron adquiridas en establecimientos comerciales y abiertos momentos antes del análisis de la capacidad antioxidante.

## Equipo

La propulsión de las diferentes disoluciones se realizó con una bomba peristáltica de la marca Gilson modelo Minipuls 3 de cuatro canales con tubos de propulsión de la misma marca. Estas mantienen un flujo constante de transportador y muestras en el montaje. La introducción de las muestras y patrones en el flujo del transportador se realizó mediante una válvula de inyección de cuatro vías Rheodyne. El registro de las señales analíticas se llevó a cabo utilizando un potencióstato AUTOLAB PGSTAT 30 (Eco Chemie, Holanda), conectado a una computadora equipada con el software GPES versión 4.6, el cual registra las señales analíticas (intensidad) en función del tiempo. Los diferentes componentes del montaje se unieron por tubos de teflón de 0.8 mm de diámetro interno de la marca Omnifit, ligadores y terminales Gilson. La celda electroquímica de flujo consta de dos electrodos tubulares de pasta de carbono y un electrodo de referencia de fabricación propia.

## Ciclo analítico

El sistema de análisis optimizado (Fig. 1) comienza con la inyección de una alícuota de 50.0  $\mu\text{l}$  de muestra en el caudal donde fluye la disolución acarreadora. La muestra se acondiciona en el reactor R1 (14.0 cm) y se detecta amperométricamente a un potencial de 0.75 v (vs Ag/AgCl). A éste potencial el Trolox contenido en los estándares se oxida de acuerdo a la reacción:  $\text{HTrolox}_{\text{red}} \rightarrow \text{Trolox}_{\text{ox}} + \text{H}^+ + 2\text{e}^-$

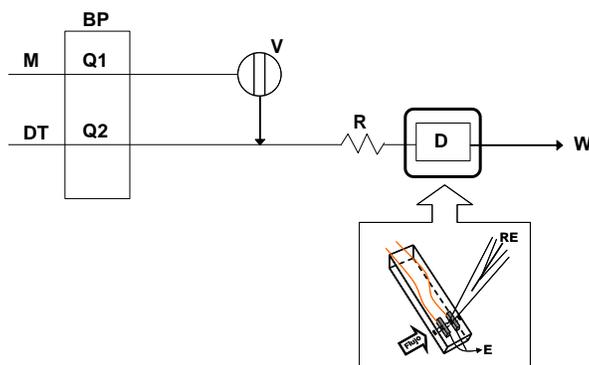


Figura 1. Esquema del montaje FIA utilizado en la determinación de la capacidad antioxidante de los vinos. BP, bomba peristáltica; Q, caudal; M, muestra; DT, disolución transportadora; V, válvula de inyección; R, reactor; D, detector tubular; E, electrodo auxiliar y de trabajo; RE, electrodo de referencia (Ag/AgCl); W, desecho.

## Metodología de referencia

Las muestras se analizan utilizando curvas de valoración espectrofotométricas a una longitud de onda de 320 nm [4]. Las muestras de vino son diluidas 1:10 y posteriormente son valoradas con Ce(IV) a una concentración de  $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ . La disolución de Ce(IV) se estandariza con sal de Mohr y los resultados se expresan como  $\text{mg}_{\text{Trolox}} \text{ l}^{-1}$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Optimización de las variables electroquímicas

Antes de evaluar las variables del sistema FIA se estudiaron las variables electroquímicas con el propósito de obtener la mayor sensibilidad. Las variables optimizadas fueron el valor de pH de la disolución acarreadora y potencial de trabajo. Para realizar los experimentos se establecieron los siguientes valores para las variables del sistema FIA: un volumen de inyección de 60.0  $\mu\text{L}$ , un caudal de  $0.7 \text{ ml min}^{-1}$  y una longitud de reactor de 60.0 cm. Las variables fueron evaluadas de forma univariable en un rango de

concentración de trolox de 15-60 ppm.

El pH de la disolución acarreadora se evaluó en el intervalo de 3.0 a 5.0, encontrándose que la disolución amortiguadora de citratos (0.5 mol l<sup>-1</sup>) de pH 4.5 es la que proporciona una mejor sensibilidad. Para determinar el potencial de trabajo se realizaron experimentos utilizando un potencial aplicado en el intervalo de 0.6-0.8 V (vs Ag/AgCl), manteniendo los valores de las variables FIA ya establecidos y un pH de 4.5. La mejor sensibilidad obtenida se observa a un valor de potencial igual o mayor a 0.75 V, por lo que se decidió fijar éste como el potencial de trabajo.

### Optimización de las variables de flujo

Según estudios anteriores los principales parámetros operacionales correspondientes al sistema FIA: volumen de inyección de la muestra, caudal de la disolución transportadora y longitud del tubo donde ocurre la dispersión (reactor), son los principales factores que afectan significativamente la respuesta de los detectores amperométricos [5].

La evaluación de las variables FIA se basó en un diseño factorial completo a dos niveles. El cual nos permitió valorar el efecto que ejercen algunos factores experimentales sobre la altura de la señal analítica (en µA). Con este fin se estudiaron el efecto del volumen de inyección, del caudal de la solución transportadora y la longitud del reactor. Se precisan por tanto 2<sup>3</sup> = 8 experiencias, que al realizarse por duplicado se convierten en 16. Las experiencias se realizaron utilizando una disolución de trolox de 15.0 mg l<sup>-1</sup> de concentración.

Cada factor toma a dos niveles que se denominaron alto (+) y bajo (-). La elección de estos niveles (recogidos en la Tabla 1) se realizó de acuerdo a experiencias previas.

Tabla 1. Niveles de los factores a optimizar.

Factores	Nivel	
	Bajo (-)	Alto (+)
Volumen de inyección ( <b>Vi</b> ) (µL)	30.0	100.0
Caudal ( <b>Q</b> ) (mL.min <sup>-1</sup> )	0.5	1.5
Longitud del reactor ( <b>R</b> ) (cm)	30.0	90.0

El diseño factorial consiste en medir la respuesta para todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores elegidos (Tabla 2). Se obtiene el FIAGrama correspondiente a 2 inyecciones repetidas. Las medidas se realizaron aleatoriamente para no introducir efectos extraños adicionales. Los valores experimentales obtenidos para las diferentes combinaciones de los niveles se encuentran recogidos en la Tabla 2.

Tabla 2. Combinación de niveles y resultados obtenidos para los mismos.

R	Q	Vi	Señal analítica (µA)		Media
-	-	-	0.1139	0.1418	0.1278
+	-	-	0.3551	0.4159	0.3855
-	+	-	0.2567	0.3736	0.3152
-	-	+	0.1004	0.1275	0.1139
-	+	+	0.1176	0.1431	0.1304
+	-	+	0.2373	0.2986	0.2679
+	+	-	0.4841	0.5605	0.5223
+	+	+	0.3255	0.3458	0.3356

La estimación del efecto que ejerce cada factor e interacción y varianza, así como el factor  $F$  calculado se encuentran recogidos en la Tabla 3.

Tabla 3. Factores  $F$  obtenidos en el diseño factorial utilizado para evaluar las condiciones de análisis de la capacidad antioxidante de vinos utilizando FIA

Factor	Efecto	Varianza	$F_{\text{calculado}}$
<b>Vi</b>	0.2060	0.1698	92.0061
Q	0.1021	0.0417	22.5849
<b>R</b>	-0.1257	0.0632	34.2706
Vi-Q	0.0002	0.0000	0.0001
Vi-R	-0.0264	0.0028	1.5107
Q-R	-0.0600	0.0144	7.8055
Vi-Q-R	0.0255	0.0026	1.4053

Los factores resaltados son estadísticamente significativos en el ANOVA de los resultados ( $F_{\text{calculado}} > 7.571$  para un 95% de nivel de confianza).

Para determinar si la influencia de un factor o interacción es significativa se lleva a cabo una prueba de significación  $F$ .  $F_{\text{calculado}}$ , el cociente de la varianza de cada uno de los factores y de los residuales, nos proporciona el  $F_{\text{calculado}}$  y  $F_{\text{crítico}}=F_{1,8}=7.571$  (95 %). Si  $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$  se acepta la hipótesis alternativa que postula que “la influencia del factor individual o de la mezcla de factores es significativa”. Así se llegó a la conclusión de que inflúan significativamente sobre la respuesta el volumen de inyección y la longitud del reactor, siendo el primero el que influía más fuertemente. El caudal del transportador no influía significativamente en los valores elegidos, motivo por el cual se fijó a un valor de  $1.0 \text{ min}^{-1}$ .

Una vez identificados los diferentes factores e interacciones que afectan a la respuesta de nuestro sistema FIA se utilizó el método SIMPLEX Super Modificado (SMS) [6] para determinar la combinación de los niveles del factor que proporcionan la respuesta óptima. Al cabo de 5 experiencias se alcanza el valor máximo de altura de señal cuando el volumen de inyección es de  $90.0 \mu\text{L}$  y la longitud de reactor es de  $14.0 \text{ cm}$ .

### Parámetros analíticos

Bajo las condiciones optimizadas según se describió, se realizaron las líneas de calibrado utilizando disoluciones estándar en el intervalo de concentraciones entre  $5.0$  y  $100.0 \text{ mg l}^{-1}$ . La altura de la señal obtenida ( $\mu\text{A}$ ) se midió por triplicado, construyéndose las líneas de calibrado a partir de las alturas medias. Las líneas de calibrado muestran una dependencia lineal entre la intensidad media y la concentración de trolox presente en la disolución estándar. El FIagrama obtenido en condiciones óptimas y los parámetros de regresión de las líneas de calibrado se muestran en la Figura 2 y la Tabla 4, respectivamente.

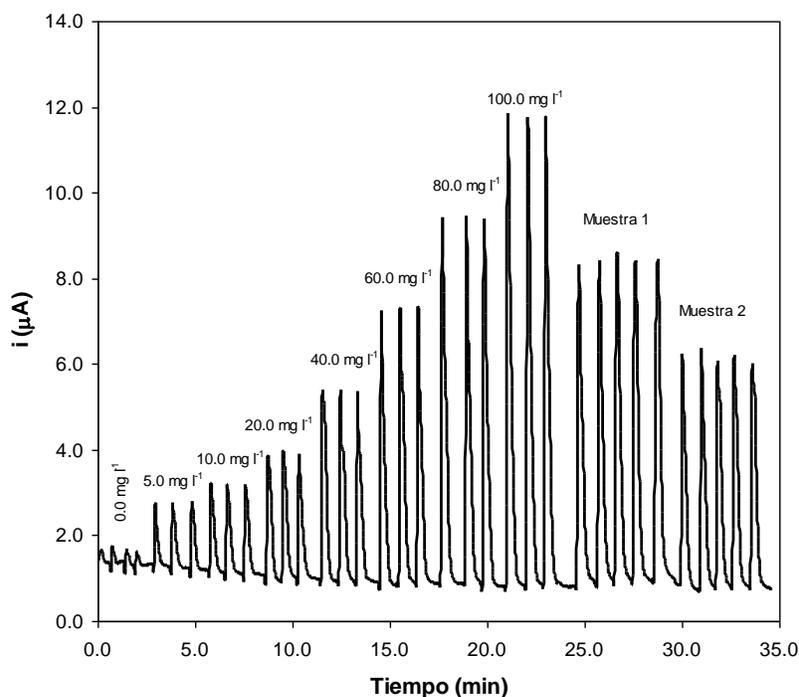


Figura 2. FI-grama correspondiente a la inyección de disoluciones patrón de trolox de 0.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 60.0, 80.0 y 100.0 mg l<sup>-1</sup> y muestras de vino. Q, 1.0 ml min<sup>-1</sup>; V<sub>i</sub>, 90.0 μl; R, 14.0 cm.

Tabla 4. Parámetros de regresión de las líneas de calibrado, altura (u.a.) vs concentración de trolox (mg l<sup>-1</sup>).

Parámetro	Línea calibrado Trolox
Raíz cuadrada de la varianza residual, s <sub>e</sub>	0.0332
Ordenada en el origen, b <sub>0</sub> ±ts(b <sub>0</sub> )	0.2699±0.4334
Pendiente, b <sub>1</sub> ±ts(b <sub>1</sub> )	0.0947±0.0082
Intervalo lineal (mg l <sup>-1</sup> )	5.0-100.0
Límite de detección (mg l <sup>-1</sup> )	1.0
Repetitividad (%DSR, n=3, 60.0 mg l <sup>-1</sup> )	0.68
Reproducibilidad (%DSR, n=3, 60.0 mg l <sup>-1</sup> )	2.86
Velocidad de muestreo (muestra h <sup>-1</sup> )	60.0

### 3.3 Análisis de muestras

El método optimizado se aplicó a muestras de vinos disponibles en el mercado. Los resultados obtenidos para cada una de las muestras se exponen en la Tabla 5. La concentración determinada se presenta como la media de 5 determinaciones independientes de Trolox, las muestras también fueron determinadas por el método de referencia.

Para cada muestra se obtuvo el promedio de la capacidad antioxidante usando ambos métodos y comparándose los resultados mediante una prueba t, asumiendo varianzas iguales (confirmando con una prueba F). Los valores de t<sub>calculada</sub> fueron comparados con t<sub>tabulada</sub> a 4 grados de libertad al 95% de confianza (t=2.23). Este análisis reveló que no hay diferencias significativas entre los resultados provenientes de cada método.

Tabla 5. Capacidad antioxidante (media y %DER, n=5) en muestras de vino determinado por el método de flujo propuesto y comparación con valoraciones UV-Vis. Unidades de concentración, mg<sub>Trolox</sub> l<sup>-1</sup>.

Muestra	SIA	UV-Vis	t <sub>calculada</sub>
1	68.2(1.5)	66.1(6.9)	0.8
2	58.5(1.7)	57.9(2.9)	0.5
3	63.3(2.7)	59.5(3.8)	2.5
4	61.2(1.4)	59.1(7.3)	2.0
5	6.8(3.2)	5.1(2.1)	2.1

### Conclusiones

Se desarrolló un sistema de análisis de inyección en flujo con detección amperométrica el cual permite el análisis de 60.0 muestras h<sup>-1</sup> con un consumo de reactivos mínimo. El método diseñado demostró ser efectivo para la determinación de la capacidad antioxidante en vinos. Debido a que la medida es de carácter global no se presentan interferencias, el potencial de medida se impone con la finalidad de oxidar los componentes de la muestra con propiedades redox, para finalmente expresar los resultados como mg<sub>Trolox</sub> l<sup>-1</sup>. La inyección de las muestras de vinos blancos, rosados y tintos sin tratamiento le proporciona al sistema diseñado una ventaja adicional en comparación con otras metodologías propuestas.

### Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado con el apoyo del proyecto CONACYT CB-2006-61310.

### Referencias

- [1] P. Baardseth. Food additives and contaminants. **6**, 201-207 (1989)
- [2] J. A. Vinson, H. Yong, X. Su, and L. Zubik. Journal of Agriculture and Food Chemistry, **46**, 3630–3634 (1998)
- [3] A.J. Blasco, A. Gonzalez-Crevillen, M.C. González, A. Escarpa, Electroanalysis, **19**, 2275-2286 (2007)
- [4] D. Ozyurt, B. Demirata, R. Apak. Talanta, **71**, 1155-1165 (2007)
- [5] J.M. Bosque-Sendra, L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, Analytical and Bioanalytical Chemistry, **377**, (2003) 863-874
- [6] J.N. Miller, J.C. Miller. Estadística y quimiometría para química analítica. Pearson, Madrid (2002)