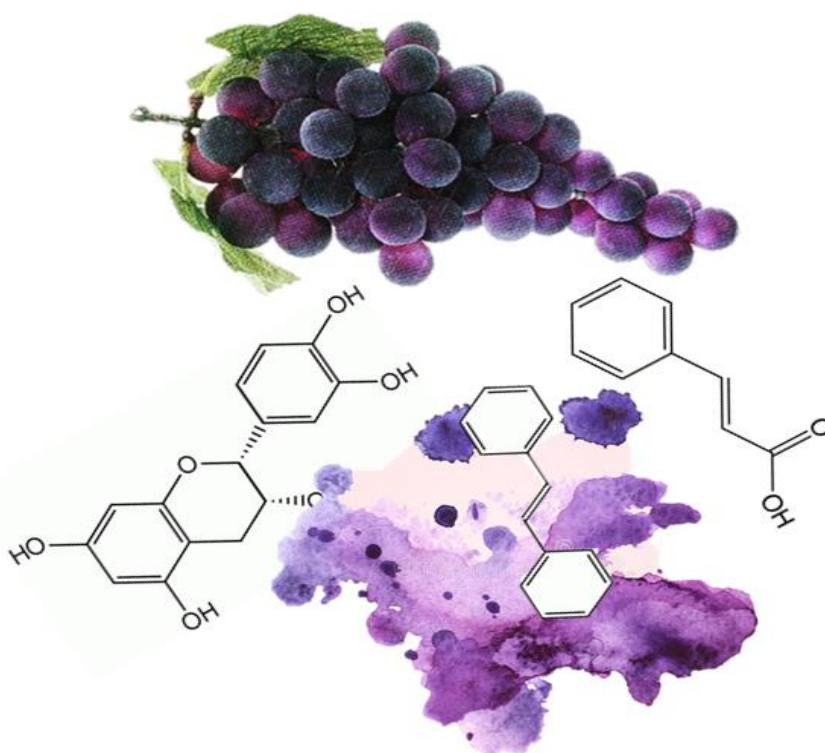


Desarrollo y aplicación de técnicas y análisis de flavonoides en frutas



Máster Interuniversitario en
Agroalimentación

Curso

2017-2018

Ana Velasco González de Peredo

Tutores: Marta Ferreiro González

Estrella Espada Bellido

Producción Agroalimentaria

Perfil Investigador

Septiembre de 2018



Desarrollo y aplicación de técnicas y análisis de flavonoides en frutas

Ana Velasco González de Peredo

Máster Interuniversitario en
Agroalimentación

2017-2018

Memoria presentada por
ANA VELASCO GONZÁLEZ DE PEREDO
Para optar al Máster Interuniversitario en Agroalimentación

Fdo.: Ana Velasco González de Peredo


Dra. Dña. Marta Ferreiro González y Dra. Dña. Estrella Espada Bellido, profesoras del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz

HACEN CONSTAR:

Que el presente trabajo de investigación titulado: “Desarrollo y aplicación de técnicas y análisis de flavonoides en frutas” ha sido realizado bajo su tutorización por Dña. Ana Velasco González de Peredo para optar al Máster Interuniversitario en Agroalimentación por la Universidad de Cádiz.

Y para que conste, expiden y firman el presente documento

En Puerto Real, a 21 de julio de 2018



Fdo.: Dra. Dña. Marta Ferreiro González



Fdo.: Dra. Dña. Estrella Espada Bellido

*Las buenas ideas, como las uvas, crecen en
racimos.*

Anónimo

Agradecimientos

El trabajo realizado se engloba dentro del proyecto “Identificación de regiones implicadas en la acumulación de compuestos saludables en el genoma de la uva de mesa (RTA2014-00083-C03-03)” en el que se encuentra como participante el Instituto de Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Rancho de la Merced. Por ello, se desea agradecer tanto al IFAPA como al INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria) y al FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional, en el marco del Programa Operativo bajo la Inversión para el Crecimiento 2014-2020) por su apoyo financiero. Además, un especial agradecimiento a la Dra. Zulema Piñeiro por su apoyo y aportación al trabajo realizado.

A continuación, agradecer también al grupo de investigación Químico-Analítica en Vitivinicultura y Agroalimentación (AGR122) y al Instituto de Investigaciones Vitivinícolas y Agroalimentarias (IVAGRO) por la cesión de las instalaciones y los equipos sin los cuales no podría haber sido posible la realización de este Trabajo de Fin de Master. Además, un especial agradecimiento a Ceferino Carrera, por ayudarme a enfrentarme a ese “super” equipo que es el UPLC.

A mis tutoras, Marta Ferreiro y Estrella Espada, a Gerardo Fernández y Miguel Palma, por transmitirme todo su conocimiento y sus buenos consejos, por ofrecerme su incansable apoyo y no dejar que me desanimase nunca. Las piedras en el camino son más fáciles de sortear con vosotros de mi lado.

A mis amigos de aquí, que son compañeros de batalla y que entienden todas mis dudas e inquietudes. A mis amigos de fuera, que aunque a veces piensan que “hablo en chino” me apoyan y alegran.

A mi familia y a mi novio, por estar siempre ahí, y eso a fin de cuentas, es siempre lo más importante.

Y como siempre en todo lo que hago, gracias a mi Mama. Porque me entiende aunque no entienda lo que hago, porque se agobia cuando me quedo tarde en la Universidad, porque me prepara los tupperts para las tardes largas de trabajo. Alguien que lucha y apoya con fuerza mis méritos como si fuesen suyo, te quiero.

Índice

1. Resumen	1
2. Summary	2
3. Introducción	3
4. Materiales y Métodos.....	4
5. Resultados y Discusión.....	5
6. Conclusiones	33
7. Plan de difusión	34
8. Bibliografía	35
9. Anexos	41



1. Resumen

La uva (*Vitis vinifera* L.), una de las frutas con mayor producción a nivel mundial, presenta una elevada concentración en compuestos fenólicos y especialmente en flavonoides. Estos compuestos fenólicos son de gran interés a nivel de salud de los consumidores y de calidad de la materia prima y sus productos. Su consumo reduce la probabilidad de desarrollar enfermedades crónicas, como problemas cardiovasculares, diabetes y cáncer. Además, son uno de los parámetros de calidad más importantes en los vinos debido a su influencia en propiedades sensoriales, como el color, la estabilidad, el amargor y la astringencia. Por ello, el conocimiento sobre la composición fenólica de las uvas y sus derivados es un gran desafío en la actualidad.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ha sido la técnica más empleada en los últimos años para el análisis de compuestos fenólicos en matrices naturales. En este trabajo, se propone el empleo de la cromatografía líquida de ultra eficacia (UHPLC) ya que proporciona separaciones en un menor tiempo, mayor resolución y sensibilidad. Concretamente, se ha desarrollado un nuevo método cromatográfico para la determinación y cuantificación de 27 de los principales compuestos fenólicos (entre ellos flavonoides) presentes en la uva mediante detección de matriz de fotodiodos y fluorescencia (UHPLC-DAD-FLR). Los compuestos analizados han sido: ácido gálico, ácido protocatéquico, ácido clorogénico, ácido vainílico, ácido cafeico, ácido sirínico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido caftárico, miricetina, rutina, quercetina 3-*O*-rhamnósido, quercetina 3-*O*-glucósido, quercetina 3-*O*-galactósido, kaempferol, quercetina, catequina, epicatequina (EC), epicatequina galato (ECG), epigallocatequina galato (EGCG), *trans*-resveratrol, ϵ -viniferina, *trans*-piceido, procianidina B₁, procianidina B₂ y procianidina A₂. El método se validó mediante el estudio de la linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión, selectividad y robustez.

El método se aplicó con éxito a distintas variedades de uva, permitiendo analizar y cuantificar 17 compuestos fenólicos. Los resultados obtenidos demuestran que los compuestos fenólicos permiten clasificar las uvas, lo cual es de gran interés para la enología. Además, también se demuestra que indistintamente de la variedad, los compuestos fenólicos se clasifican en familias con características semejantes.



2. Summary

The grape (*Vitis vinifera* L.), one of the fruits with greater production worldwide, has a high concentration of phenolic compounds and especially flavonoids. These phenolic compounds are of great interest in terms of consumer health and quality of the raw material and its products. Its consumption reduces the likelihood of developing chronic diseases, such as cardiovascular problems, diabetes and cancer. In addition, they are the most important parameters in sensory properties, such as color, stability, bitterness and astringency. Therefore, knowledge about the understanding of phenolic composition in grapes and their derivatives is a great challenge nowadays.

High performance liquid chromatography (HPLC) has been the technique most used in recent years for the analysis of phenolic compounds in natural matrices. In this work, the use of ultra efficient liquid chromatography (UHPLC) is proposed since it offers separations in a shorter time, greater resolution and sensitivity. Specifically, a new chromatographic method has been developed for the determination and quantification of 27 phenolic compounds (including flavonoids) present in the grape by photodiode and fluorescence detector (UHPLC-DAD-FLR). The compounds analyzed were: gallic acid, protocatechuic acid, chlorogenic acid, vanillic acid, caffeic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, caftaric acid, myricetin, rutin, quercetin 3-*O*-rhamnósíde, quercetin 3-*O*-glucoside, quercetin 3-*O*-galactoside, kaempferol, quercetin, catechin, epicatechin (EC), epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin gallate (EGCG), *trans*-resveratrol, ϵ -viniferin, *trans*-piceid, procyanidin B₁, procyanidin B₂ and procyanidin A₂. The method was validated through the study of linearity, the limits of detection and quantification, precision, selectivity and robustness.

The method was applied successfully to different grape varieties, allowing to analyze and quantify 17 phenolic compounds. The results show that phenolic compounds allow to classify the grapes that are of great interest for oenology. Besides, it is also shown that it is indistinctly of the variety, the phenolic compounds are classified in families with similar similars.



3. Introducción

En este trabajo se llevó a cabo el estudio de los principales compuestos fenólicos en fruta, concretamente en 210 variedades distintas de uvas. Aunque *a priori* se decidió enfocar el trabajo únicamente en el análisis de flavonoides en distintas muestras de frutas, finalmente éste se amplió al análisis de compuestos fenólicos, no solo flavonoides, en muestras de uvas. Este cambio estuvo motivado por el interés que mostraban los responsables del proyecto de investigación en el que se engloba este trabajo en el estudio tanto de los flavonoides como no flavonoides. Por ello, al ampliar las familias de compuestos fenólicos estudiados y disponer de una gran variedad de uvas para su análisis (proporcionadas por el IFAPA Rancho de la Merced) se decidió centrar el estudio únicamente en matrices de uvas.

3.1. Uva (*Vitis vinifera* L.)

La uva (*Vitis vinifera* L.), es una de las frutas con mayor producción a nivel mundial. En 2013, su producción superó las 75 millones de toneladas. Los compuestos fenólicos, que se encuentran naturalmente en las plantas y frutas, se consideran uno de los más valiosos entre los micronutrientes.¹ Concretamente, en los racimos de uva, los compuestos fenólicos se encuentran principalmente en las partes sólidas (piel, semilla y tallo) y en la pulpa, mostrando una gran diversidad de estructuras.²

Existe una relación importante entre la cantidad y estructura de los compuestos fenólicos y el potencial enológico de la uva,³ ya que influyen en el color, la estabilidad, el amargor y la astringencia de los vinos.⁴ El color, especialmente en los vinos tintos, se debe a su efecto de copigmentación,⁵ ya que los copigmentos actúan como un punto de partida para las reacciones que conducen a la preservación del color a largo plazo. Por estas razones, los investigadores, productores e industrias, prestan una creciente atención al estudio del perfil fenólico de la uva, así como a los factores que lo influyen. A pesar de que todas las variedades de uvas presentan una elevada concentración en compuestos fenólicos, existen diversos factores que afectan al perfil polifenólico: la variedad, las condiciones climáticas, las características del suelo, el estrés ambiental, las prácticas agronómicas, etc.^{6,7}



Por tanto, el hecho de que los compuestos fenólicos influyan en la calidad de los vinos ha supuesto que las investigaciones sobre métodos rápidos, versátiles y de alto rendimiento para su análisis sean cada vez más importantes. Además, a todo esto hay que sumarle el hecho de que la uva cruda y los productos elaborados a partir de ella (vinos, zumos, concentrados, etc.), proporcionan múltiples beneficios a la salud, principalmente por la fuerte actividad antioxidante de los compuestos fenólicos.⁸

3.1. Sustancias antioxidantes

En los últimos años ha habido un aumento del interés por parte de la población en las sustancias naturales con actividad antioxidante.⁹ Esto es debido en gran medida a que numerosos estudios respaldan una relación positiva entre las sustancias antioxidantes y la prevención contra enfermedades.¹⁰

A pesar de que nuestro cuerpo cuenta con sustancias antioxidantes propias, a veces estas no son suficientes y se crea un desbalance negativo entre la cantidad de radicales libres y los niveles de antioxidantes. Por ello, es de gran importancia introducir sustancias antioxidantes extras al cuerpo.¹¹ Concretamente, las frutas, especialmente las de colores morados, se han convertido en los sustitutos idóneos de los antioxidantes sintéticos.¹²

Las principales sustancias antioxidantes son las vitaminas (A, B₆, C, E), zinc, selenio y compuestos fenólicos,¹³ cuyo estudio será el objetivo principal de este trabajo.

3.2. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen un grupo de sustancias químicas ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Forman parte de los llamados metabolitos secundarios, es decir, de aquellos compuestos sintetizados por las plantas como defensa frente a situaciones de peligro (herbívoros y patógenos, protección solar, plantas competidoras, etc.) o como forma de interacción entre plantas y plantas-animales.¹⁴

Todas las estructuras fenólicas tienen en común que están formadas por un anillo aromático unido al menos a un grupo hidroxilo (-OH). A partir de esta estructura básica, los múltiples compuestos fenólicos se diferencian y clasifican en base al número y disposición de los átomos de carbono. Concretamente, los principales compuestos



fenólicos encontrados en matrices vegetales pueden clasificarse en dos grupos: los flavonoides y los no flavonoides.³

3.2.1. Flavonoides

Los flavonoides son un tipo de compuestos fenólicos caracterizados por presentar un esqueleto C₆-C₃-C₆. En su nivel más básico (Figura 1) están constituidos por dos anillos fenólicos (anillo A y B) unidos por tres átomos de carbono, los cuales se encuentran formando generalmente un heterociclo (anillo C).¹⁵

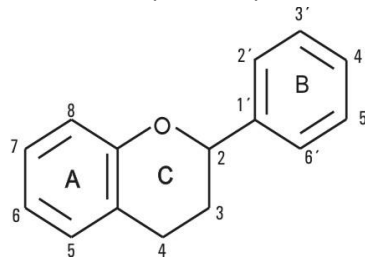


Figura 1. Estructura básica de los flavonoides.

Dentro de los flavonoides podemos encontrar varios tipos de compuestos en función del grado de insaturación y sustituyentes del anillo C, principalmente flavanoles, flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, chalconas y antocianidinas. En este trabajo concreto nos hemos centrado en el estudio de los flavonoles, (Figura 2a), (quercetina, quercetina 3-*O*-rhamnósido, quercetina 3-*O*-glucósido, quercetina 3-*O*-galactósido, kaempferol, miricetina y rutina) y de los flavanoles, (Figura 2b), (catequina, epicatequina, epicatequina-3-*O*-gallato (ECG), epigallocatequina-3-*O*-gallato (EGCG), procianidina B₁, procianidina B₂ y procianidina A₂).

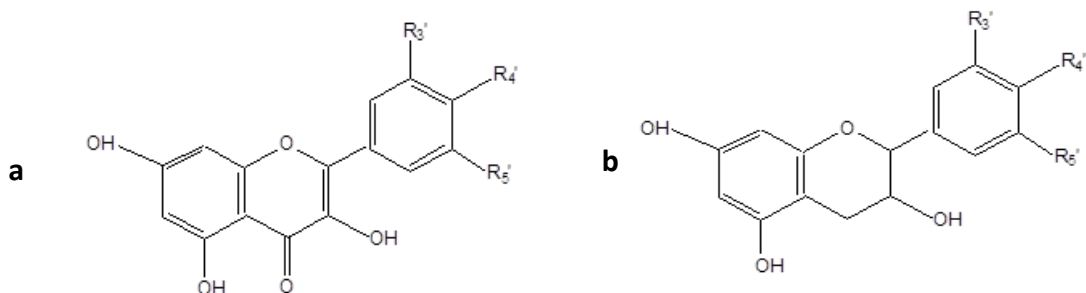


Figura 2. a) Estructura de los flavonoles, b) Estructura de los flavanoles.

3.2.2. No flavonoides

Los no flavonoides son el resto de compuestos fenólicos que no comparten una estructura común, constituidos fundamentalmente por los ácidos fenólicos simples (benzoicos y cinámicos) y estilbenos.



3.2.2.1. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos, compuestos fenólicos mayoritarios en la dieta, pueden ser de dos tipos: ácidos benzoicos, (Figura 3a), (C_6-C_1) o ácidos cinámicos, (Figura 3b), (C_6-C_3), en función del patrón de sustitución del anillo.¹⁶

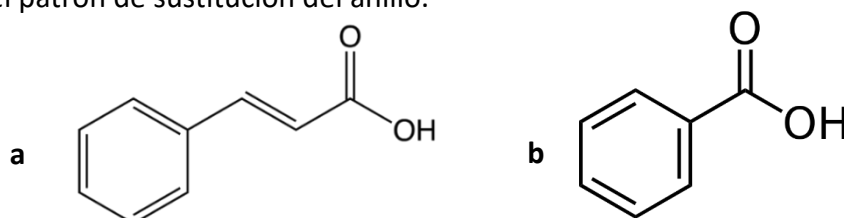


Figura 3. a) Estructura de los ácidos benzoicos, b) Estructura de los ácidos cinámicos.

En muchas ocasiones, estos ácidos se encuentran hidroxilados recibiendo el nombre de ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos. Los hidroxibenzoicos que se han estudiado en este trabajo son: ácido gálico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido protocatéquico, ácido vainílico y ácido siríngico. Los hidroxicinámicos que han sido estudiados son: ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido caftárico y ácido clorogénico, siendo los dos últimos, ésteres del ácido cafeico con el ácido tartárico y el ácido quínico, respectivamente.

3.2.2.2. Estilbenos

Los estilbenos son compuestos fenólicos con fórmula molecular $C_{14}H_{12}$. Aunque pueden presentar dos formas isómeras (*E*-estilbeno y *Z*-estilbeno), en la naturaleza se encuentra normalmente el *E*-estilbeno (Figura 4) debido al impedimento estérico que presenta el otro isómero.

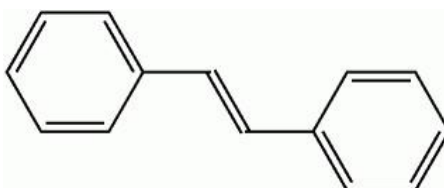


Figura 4. Estructura básica del *E*-estilbeno.

Existen una gran variedad de estos compuestos siendo los más característicos los estilbenoides, derivados hidroxilados del estilbeno. Se estudian en este trabajo el *t*-resveratrol, el *t*-piceido (estilbenoide unido a un azúcar) y la ϵ -viniferina (estilbenoide dímero del resveratrol).¹⁷



3.3. Interés del estudio de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos, presentes en múltiples alimentos como tomates,¹⁸ uvas,¹⁹ setas,²⁰ etc., se han convertido en un frente de investigación importante en la actualidad por los múltiples intereses y beneficios que genera su consumo.

Los compuestos fenólicos juegan un importante papel en las propiedades nutricionales y sensoriales de frutas y vegetales ya que intervienen en el amargor, astringencia, color y estabilidad.²¹ Además, ayudan a preservar el sabor, color y evitar la destrucción de vitaminas y la oxidación de los lípidos en los alimentos.²² Esto es muy importante en enología ya que en función del perfil fenólico de la variedad de uva, el vino resultante a partir de ella será diferente y único. Por otro lado, estos compuestos han llamado la atención por sus propiedades biofuncionales, ya que independientemente del valor nutricional del alimento, los alimentos que los presentan ayudan a mantener un buen estado de salud y reducir el riesgo de padecer ciertas enfermedades. Concretamente, estos compuestos muestran propiedades antidiabéticas, antiinflamatorias, anticancerígenas y antisépticas.²³

Por todo ello, las empresas alimentarias y de salud están invirtiendo en métodos analíticos que permitan analizar y cuantificar el contenido fenólico en alimentos de manera rápida, versátil y sencilla en muestras complejas, como uvas.²⁴

3.5. Técnicas de extracción: Extracción asistida por microondas (MAE)

Entre los métodos de extracción de compuestos fenólicos más empleados destaca la extracción asistida por microondas (MAE). Esta es una técnica ampliamente usada como técnica “verde de extracción” ya que reduce tanto el tiempo de extracción como el uso de disolventes.²⁵ La MAE está basada en la capacidad de las ondas microondas (ondas electromagnéticas de alta frecuencia, entre 0,3 – 300 GHz) de causar un movimiento molecular de rotación mediante rotación dipolar, calentando tanto el disolvente como la muestra.²⁶ Al producirse un aumento de la temperatura rápido y localizado, aumenta la presión en las células de la matriz, produciéndose una transferencia de los componentes de las células al disolvente de extracción.²³ Esta técnica ha sido ampliamente empleada en la extracción de compuestos fenólicos en una gran cantidad de matrices como moras²⁶, tomates²⁷ o uvas.²⁸



3.6. Técnicas de separación y análisis

3.6.1. Cromatografía líquida (CL)

La cromatografía es una técnica de separación muy importante y utilizada en muchos campos. Dentro de la CL destaca la cromatografía en columna, la cual se caracteriza porque la fase móvil, en este caso un líquido, impulsa a la muestras a través de una columna donde se encuentra colocada la fase estacionaria. La separación se basa en la diferente distribución de los componentes de la muestra entre ambas fases, en la que algunos muestran más afinidad para ser retenidos por la fase estacionaria mientras que otros son arrastrados con más facilidad por la fase móvil, produciéndose la separación.

3.6.2. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y ultra eficacia (UHPLC)

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es un tipo de cromatografía instrumental en columna con una fase móvil líquida y una fase estacionaria sólida, donde la fase móvil es forzada a través de la columna mediante la aplicación de alta presión. Esta presión provoca un incremento de la velocidad lineal de los compuestos, reduciendo así su difusión dentro de la columna y mejorando la resolución del cromatograma.²⁹

La cromatografía líquida de ultra eficacia (UHPLC) supone un avance más en las técnicas cromatográficas ya que emplea partículas muy pequeñas, con diámetros inferiores a 2 μm , lo cual está de acuerdo con la teoría de Van Deemter.³⁰ Esto da lugar a separaciones de mayor resolución y sensibilidad en periodos de tiempo muy cortos y por tanto, con un menor gasto de disolventes.³¹ El empleo de partículas tan pequeñas supone además la necesidad de aplicar elevadas presiones, a veces superiores a los 100 bares, para que la fase móvil sea capaz de fluir a través de la columna.³²

Ambas técnicas, ocupan una posición de liderazgo en el análisis de compuestos fenólicos. La HPLC se ha empleado en el análisis de compuestos fenólicos de muchos tipos de muestras como patatas,³³ kiwi,³⁴ fresas³⁵ y uvas,³⁶ mientras que la UHPLC se ha empleado en muestras como açai,³⁷ lechuga,³⁸ moras³⁹ y uvas.⁴⁰

A la hora de separar compuestos fenólicos, lo más extendido para ambas técnicas es el uso de la fase reversa. En la cromatografía de fase reversa la fase móvil está basada en disolventes polares mientras que la fase estacionaria suele estar basada en partículas



sólidas recubiertas de algún componente apolar. Se suelen emplear columnas del tipo C-18, combinadas con sistemas de elución binarios: un disolvente polar acidificado (generalmente agua) y un disolvente orgánico menos polar como metanol o acetonitrilo.⁴¹

Con respecto a los detectores, los sistemas de HPLC y UHPLC se encuentran frecuentemente acoplados a los siguientes sistemas de detección: ultravioleta-visible (UV-vis),⁴² matriz de fotodiodos (DAD),⁴³ electroquímicos (ED),⁴⁴ espectrometría de masas (MS)⁴⁵ y detectores de fluorescencia (FRL). El empleo de detectores de fluorescencia permite aumentar la selectividad y la sensibilidad en la determinación de ciertos compuestos fenólicos,⁴⁶ al ser el procedimiento de detección fluorimétrica más sensible y específico que la detección UV-vis. Concretamente, los detectores de fluorescencia son muy útiles para el estudio de la catequina, la epicatequina y los isómeros del resveratrol, altamente fluorescentes.⁴⁷

3.6.3. Desarrollo de un método cromatográfico en uvas

Debido al gran interés actual por el estudio de los compuestos fenólicos y sobre todo por aquellos presentes en matrices de uvas, ha surgido la necesidad de desarrollar métodos para la determinación simultánea de una amplia gama de estos compuestos. Aunque HPLC es la técnica más empleada tradicionalmente para su estudio,⁴⁸ ésta puede dar lugar a largos tiempos de análisis y bajas resoluciones debido a la complejidad de las muestras de uva.² El número de analitos detectados simultáneamente por la mayoría de los métodos de HPLC suele ser de alrededor de 10, siendo necesario tiempos de análisis de 45 o 50 minutos para su correcta separación.⁴⁹ Además, los límites de detección no suelen ser en muchos casos suficientes para cuantificar los flavonoides a niveles de trazas, dando esto lugar a resultados de cuantificación no válidos.⁵⁰ Algunos de los métodos encontrados en la bibliografía para el análisis de compuestos fenólicos aparecen recogidos en la Tabla 1.^{49,51-53} Se aprecia la necesidad de disponer de métodos cromatográficos nuevos que permitan suplir las limitaciones de los métodos desarrollados hasta ahora: tiempos largos de análisis, menor número de compuestos fenólicos analizados, separación de otros compuestos minoritarios, etc.



Método cromatográfico	Compuestos fenólicos analizados	Tiempo de análisis
HPLC-MWD ⁵¹	Ácido gálico, galocatequina, OH-tirosol, ácido caftárico, tirosol, epigallocatequina, catequina, ácido cafeico, ácido siríngico, epicatequina, ácido <i>p</i> -cumárico, galocatequina gallato, ácido ferúlico, polidatina, piceatanol, quercetina 3- <i>O</i> -glucósido, kaempferol 3- <i>O</i> -glucósido, <i>t</i> ,resveratrol, ácido cinámico y quercetina.	< 11 min
UHPLC-DAD ⁵²	Ácido gálico, 5-hidroximetilfurfural, ácido protocatequico, furfural, aldehído protocatequico, ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico, ácido cafeico, ácido vainillico, <i>p</i> -hidroxibenzaldehído, metilfurfural, ácido siríngico, vainillina, ácido <i>p</i> -cumárico, siringaldehído	< 4 min
HPLC-MWD ⁵³	ácido gálico, tirosol, catequina, epicatequina, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido cumárico, ácido ferúlico, polidatina, piceatannol, <i>t</i> -resveratrol, quercetin 3- <i>O</i> -glucósido y quercetina	< 11 min
UPLC-UV-vis ⁴⁹	Ácido gálico, ácido protocatequico, ácido clorogénico, ácido vainillico, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido <i>o</i> -cumárico, ácido cinámico, GC, EGC, EGCg, CE, GCg, ECg, Cg, rutina, naringina, quercitrina, quercetina, kaempferol, daidzeína, hesperetina, ramnetina y galangina.	< 4 min

Tabla 1. *Métodos cromatográficos para el análisis de compuestos fenólicos.*

3.7. Validación del método cromatográfico

Tras el desarrollo de cualquier método analítico es fundamental llevar a cabo su validación. La validación de un método es el proceso por el cual se demuestra que los procedimientos analíticos son aptos para el uso indicado.⁵⁴ Los parámetros analíticos que deben ser considerados en un proceso de validación son:

- **Precisión:** La precisión de un procedimiento analítico indica la concordancia entre una serie de mediciones realizadas a réplicas de la misma muestra homogénea en unas condiciones concretas. Concretamente, la precisión se estudia en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.
 - Repetibilidad: Expresa la precisión en un intervalo corto de tiempo y bajo las mismas condiciones de operación.
 - Precisión intermedia: Expresa la precisión en el laboratorio pero variando los días, los equipos, los analistas, etc.
 - Reproducibilidad: Expresa la precisión entre diferentes laboratorios.



- **Linealidad:** La linealidad permite asegurar que los resultados obtenidos sean, de manera directa o mediante el uso de alguna función matemática, proporcionales a la concentración de analito dentro de un rango dado.
- **Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ):** El límite de detección se entiende como la mínima cantidad o concentración de analito que puede detectarse con fiabilidad por el método analítico, pero no necesariamente cuantificarse. Mientras que el límite de cuantificación se define como la mínima cantidad o concentración de analito que puede cuantificarse con precisión y exactitud haciendo uso del mismo método.⁵⁵
- **Robustez:** La robustez se puede definir como la capacidad que posee un método analítico de permanecer inalterado frente a ligeras variaciones en sus parámetros.

Además de la correcta validación, un método cromatográfico óptimo se caracteriza por presentar unos valores adecuados de las características cromatográficas más importantes:

- **Resolución (Rs):** la resolución se define como la separación entre dos picos en relación a la media de sus anchuras en la base. Se representa como un valor numérico cuya magnitud indica en qué proporción un pico se introduce en otro pico. Concretamente, la resolución se ve afectada por el número de platos, el factor de retención y el factor de selectividad.
- **Factor de retención (K):** El factor de retención es una medida del tiempo que un compuesto permanece en la fase estacionaria en relación con el tiempo que permanece en la fase móvil.
- **Factor de selectividad (α):** El factor de selectividad es una medida de la selectividad de la columna con respecto a un compuesto concreto.

4. Materiales y Métodos

4.1. Material biológico

El material biológico empleado en este estudio, y al cual se le aplicó el procedimiento cromatográfico desarrollado, fue una amplia gama de variedades de uva, incluyendo uvas de mesa, de vino y silvestres proporcionadas por el “Rancho de la Merced”, (Jerez de la Frontera) dentro del proyecto en el que se engloba el trabajo. Concretamente, las



uvas fueron muestreadas en los meses de julio, septiembre y octubre del 2015, congeladas y posteriormente sometidas a la MAE.

4.2. Extracción

Para la extracción de las uvas se hizo uso del método desarrollado por Piñeiro y colaboradores pero con ligeras modificaciones.⁵⁶ En primer lugar, la uva descongelada fue triturada entera en un molinillo de café. A continuación, fue extraída mediante la MAE en agua-metanol acidificado a 70 °C, durante 3 min. Tras enfriar a 10 °C durante 10 minutos, el extracto se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos, y se filtró el sobrenadante con papel de filtro. Tras recuperar el sólido, se volvió a repetir la extracción. Finalmente, se unieron los dos extractos (extracción y re-extracción) en un mismo matraz de 25 mL. Para su análisis cromatográfico se tomó un cierto volumen de ese matraz y se filtró con un filtro de jeringa de 0,20 µm. Todas las disoluciones preparadas se almacenaron en nevera (4 °C) hasta su posterior análisis.

4.3. Disolventes y reactivos

Los disolventes empleados en UHPLC fueron: ácido acético, agua Milli-Q y acetonitrilo. El agua Milli-Q se obtuvo mediante un sistema de purificación Millipore (Bedford, Massachusetts, Estados Unidos). El acetonitrilo y el metanol (Panreac, Barcelona, España) fueron de grado HPLC. El ácido acético (glacial) 100% se adquirió de Merck (Emsure, Darmstadt, Alemania).

Los estándares comerciales fueron obtenidos de Extrasynthese (Lyon, Francia) respecto los de ácido cafeico, epicatequina, kaempferol, quercetina y miricetina que se obtuvieron de Sigma-Aldrich (San Luis, Estados Unidos).

4.4. Cromatografía líquida de ultra eficacia (UHPLC)

Para poder analizar y cuantificar los compuestos fenólicos presentes en las muestras de uvas fue necesario llevar acabo *a priori* el desarrollo de un método cromatográfico mediante UHPLC-DAD-FLR, debido a que los métodos disponibles en el grupo y en la bibliografía no conseguían separar simultáneamente los 27 compuestos de interés en el proyecto. El desarrollo y validación se llevó a cabo a partir de una muestra que contenía



27 de los compuestos fenólicos mayoritarios en uvas, preparada en metanol a partir de los estándares comerciales anteriormente mencionados.

4.4.1. Equipo de cromatografía

Los análisis se llevaron a cabo en un equipo ACQUITY UPLC[®] H-Class System (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, Estados Unidos) acoplado a un detector de matriz de fotodiodos (PAD e λ Detector), a un detector de fluorescencia (FLR Detector) y a un sistema de gestión de eluyentes cuaternario (Quaternary Solvent Manager). En la Figura 5 puede observarse el equipo cromatográfico completo. Todo el sistema fue controlado mediante el Software Empower[™] 3 (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, Estados Unidos). La columna empleada fue de fase reversa, Acquity UPLC[®] BEH C18 (1,7 μ m, 2,1 x 100 mm, Waters, Milford, Massachusetts, Estados Unidos).



Figura 5. *Equipo de cromatografía UHPLC utilizado en el análisis de los compuestos fenólicos.*

4.4.2. Detectores cromatográficos

El equipo cuenta con dos detectores cromatográfico. De los 27 compuestos fenólicos, 8 de ellos (procianidina B₁, ECG, procinidina A₂, catequina, epicatequina, *t*-piceido, *t*-resveratrol y ϵ -viniferina) se estudiaron empleando el detector de fluorescencia (FLR). La procianidina A₂ presenta además el inconveniente particular de que no se separa adecuadamente en DAD. El resto de compuestos fenólicos se estudiaron empleando el detector de matriz de fotodiodos (DAD).

El DAD se ajustó a un intervalo de longitudes de onda de 210-400 nm para el barrido 3D con una frecuencia de muestro (sampling rate) de 40 pts s⁻¹. Aunque el DAD se ajustó a un intervalo de longitudes de onda, el análisis y cuantificación de cada compuesto fenólico se llevó a cabo a una longitud de onda fija (barrido 2D) en función de la longitud



de onda de máxima absorbancia de cada compuesto (Tabla 2). En el caso del detector de Fluorescencia se trabajó en 2D. Concretamente, se crearon 3 canales con las siguientes características:

a) λ_{ex} 250 y λ_{em} 395 para el estudio de la procianidina B₁, ECG y procianidina A₂. La ganancia se establece a 100 (PMT GAIN: 100).

b) λ_{ex} 290 y λ_{em} 310, para el estudio de la catequina y la epicatequina. La ganancia se establece a 100 (PMT GAIN: 100).

b) λ_{ex} 310 y λ_{em} 403, para el estudio del *t*-piceido, *t*-resveratrol y ϵ -viniferina. La ganancia se establece a 1000 (PMT GAIN: 1000). Al aumentar la ganancia se aumentó la señal de los picos de interés sin aumentar la señal del ruido.

Las longitudes de excitación y emisión seleccionadas estuvieron basadas en la longitud de onda a la cual la emisión de los compuestos da máxima señal (máxima intensidad de pico). Para conocer dichas longitudes de onda se llevó a cabo *a priori* el estudio de los compuestos en fluorescencia de barrido, es decir, en 3D.

Detector de fotodiodos (DAD)			
Compuesto fenólico	λ_{max} . Absorbancia (nm)	$\lambda_{cuantificación}$ (nm)	Rango (ppm)
Ácido protocatequico	259,0		0,3-12,9
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	254,2	259	0,3-14,7
Ácido vainílico	260,2		0,3-13,7
Ácido gálico	270,8		0,2-10,2
Procianidina B ₂	275,6	280	0,6-29,3
Ácido siríngico	274,4		0,3-13,2
EGCG	274,4		0,3-14,2
Ácido <i>p</i> -cumárico	309,0	309	0,3-13,3
Ácido cafeico	322,1		0,8-15,5
Ácido clorogénico	324,5	320	0,3-13,9
Ácido caftárico	326,9		0,3-15,4
Ácido ferúlico	322,1		0,3-13,5
Quercetina 3- <i>O</i> -galactósido	355,1		0,3-13
Rutina	355,1	350	0,2-11,5
Quercetina 3- <i>O</i> -glucósido	355,1		0,3-14,6
Quercetina 3- <i>O</i> -rhamnósido	347,9		0,2-11,8
kaempferol	371,9	370	26,8-79,7



Quercetina	371,9		0,3-14,2
Miricetina	371,9		0,3-14,2
Detector de fluorescencia (FLR)			
Compuestos	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Rango (ppm)
Procianidina B ₁	250	395	1,3-31,9
ECG	250	395	1,6-26,9
Procianidina A ₂	250	395	0,2-11,4
Catequina	310	403	0,3-12,1
Epicatequina	310	403	0,4-16,9
<i>t</i> -Piceido	290	310	0,2-9,7
<i>t</i> -Resveratrol	290	310	0,04-9,1
ϵ -Viniferina	290	310	0,1-31,8

Tabla 2. Características del análisis de compuestos fenólicos y rango de concentraciones.

4.4.3. Procedimiento cromatográfico

Los disolventes empleados en este trabajo fueron, agua Milli-Q acidificada con ácido acético (2% v/v ácido acético) (disolvente A) y acetonitrilo puro (disolvente B). Además, se empleó acetonitrilo al 40% en agua Milli-Q como disolución de lavado. Los disolventes se prepararon en matraces aforados de 1 L y se filtraron haciendo uso de filtros de membrana de poliamida de 0,2 μ m (Sartorius, Gotinga, Alemania). Posteriormente, se sonicaron en un baño de ultrasonidos S300 (Elma, Singen, Alemania) durante 5 minutos para eliminar los gases disueltos. Con respecto al volumen de inyección de muestra, el flujo de disolvente y la temperatura de columna se seleccionaron 3 μ L, 0,6 mL/min y 55 $^{\circ}$ C respectivamente. La integración de los compuestos fenólicos fue llevada a cabo de manera “automática” mediante la integración de tipo “valley to valley”, además se introdujo un valor de umbral de 10 en el campo Processing Method Threshold. Los compuestos con tiempos de retención muy próximos, tuvieron que integrarse manualmente haciendo uso de la herramienta “Split Peak”.

4.4.4. Identificación de los compuestos fenólicos en uvas

En las muestras de uva los compuestos fenólicos estudiados fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención y $\lambda_{m\acute{a}x}$ de absorción con los de los estándares comerciales. Como con el detector de fluorescencia no se pueden observar los espectros de absorción, es recomendable identificar en primer lugar los compuestos en DAD y



luego con ese tiempo de retención identificarlos en FLR, teniendo en cuenta que el tiempo de retención en FLR es algo superior al de DAD. Concretamente, el orden de elución de los compuestos fenólicos estudiados es el siguiente: 1- ácido gálico, 2- ácido protocatequico, 3- ácido caftárico, 4- ácido *p*-hidroxibenzoico, 5- procianidina B₁, 6- catequina, 7- ácido cafeico, 8- ácido vainillico, 9- ácido clorogénico, 10- procianidina B₂, 11- ácido siríngico, 12- EGCG, 13- epicatequina, 14- ácido *p*-cumárico, 15- ácido ferúlico, 16- ECG, 17- *t*-piceido, 18- procianidina A₂, 19- quercetina 3-*O*-galactósido, 20- rutina, 21- quercetina 3-*O*-glucósido, 22- quercetina 3-rhamnosido, 23- kaempferol, 24- *t*-resveratrol, 25- quercetina, 26- ϵ -viniferina y 27- miricetina.

Para llevar a cabo su cuantificación, se hizo uso de las rectas de calibrado obtenidas a partir de los estándares. Se prepararon 6 disoluciones madre a partir de las cuales se obtuvieron el resto de puntos de las rectas de calibrado.

- Disolución 1 que contenía al ácido gálico, catequina, ácido cafeico, ácido vainillico, ácido siríngico, ácido ferúlico y quercetina 3-*O*-galactósido.
- Disolución 2 que contenía al ácido clorogénico, epicatequina, kaempferol y miricetina.
- Disolución 3 que contenía al ácido protocatequico, ácido *p*-cumárico, quercetina 3-*O*-glucósido, rutina, quercetina 3-*O*-rhamnosido y quercetina.
- Disolución 4 que contenía al ácido *p*-hidroxibenzoico, procianidina B₁, procianidina B₂, EGCG, ECG y procianidina A₂.
- Disolución 5 que contenía al *t*-piceido, *t*-resveratrol y ϵ -viniferina.
- Disolución 6 que contenía al ácido caftárico.

A partir de dichas disoluciones madres, mediante dilución en metanol acuoso 50:50 (v/v) se obtuvieron las curvas de calibrado de cada uno de los compuestos fenólicos. El rango de concentraciones estudiado fue distinto para cada compuesto (Tabla 2) dependiendo de los LOD bibliográficos encontrados.^{51,57}

4.5. Proceso de validación

La validación del método cromatográfico se llevó a cabo teniendo en cuenta las recomendaciones proporcionadas en la guía ICH Q2 (R1).⁵⁴ Concretamente, se realizó un protocolo de validación para asegurar la apropiada linealidad, LOD y LOQ, precisión



y robustez del método cromatográfico desarrollado. Todos los cálculos se llevaron a cabo mediante el software Microsoft Excel 2013.

4.5.1. Linealidad

Para el estudio de dicho parámetro analítico se construyeron rectas de calibrado para cada uno de los compuestos fenólicos de interés. Concretamente las curvas fueron construidas usando 5 puntos. Una vez obtenidas las rectas de calibrado, mediante un ajuste por mínimos cuadrados, la linealidad fue evaluada mediante el cálculo de los coeficientes de determinación (R^2). Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

4.5.2. Límites de detección y cuantificación

La obtención del LOD (Ecuación 1a) y LOQ (Ecuación 1b) se basó en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente.

$$\mathbf{a} \text{ LOD} = \frac{3\sigma}{S} \quad \mathbf{b} \text{ LOQ} = \frac{10\sigma}{S}$$

Ecuación 1. a) *Cálculo del LOD*, b) *cálculo del LOQ*.

Siendo σ es la desviación estándar del blanco y S la pendiente de la curva de calibrado obtenida para cada uno de los compuestos fenólicos.⁵⁸ Para la obtención de la desviación estándar del blanco, se analizó 10 veces el blanco y se calculó la σ de las respuestas.

4.5.3. Precisión

La precisión del método desarrollado se realizó en términos de repetibilidad y precisión intermedia de los siguientes parámetros cromatográficos: tiempo de retención, área de pico, anchura de pico, altura de pico y resolución de pico. Para ello, se llevaron a cabo un total de 21 análisis independientes, 9 análisis de la misma muestra el mismo día y 12 análisis más, repartidos en los siguientes dos días consecutivos. De esta manera, se puede evaluar la precisión intermedia mediante el análisis del coeficiente de variación de los 21 datos de área de pico, tiempo de retención, anchura, resolución y altura, y la repetibilidad mediante la media de los coeficientes de variación (CV) de los datos analizados el mismo día. CV inferiores a 10% permiten afirmar la precisión dentro del ensayo.⁵⁹



4.5.4. Robustez

Para el estudio de la robustez, se realizaron varios experimentos variando en un 5% la temperatura de la columna, flujo de disolvente y volumen de inyección. Cada parámetro fue evaluado en tres niveles diferentes y por cada nivel se llevaron a cabo un total de cuatro repeticiones. Con todo ello se pretendía observar cómo la variación en un cierto porcentaje dichos parámetros afectaba a varias características cromatográficas, concretamente, al tiempo de retención, el área y la resolución de los diferentes picos. Para estudiar el efecto provocado se empleó la prueba-*t* suponiendo varianzas equivalentes, de tal manera que los resultados con un *p*-valor superiores a 0,05 se consideraron estadísticamente iguales.⁶⁰

4.6. Propiedades cromatográficas

Además, se estudiaron varias propiedades cromatográficas, la resolución (*R_s*) (Ecuación 2a), el factor de retención (*K*) (Ecuación 2b) y la selectividad (*α*) (Ecuación 2c) haciendo uso del software EZChrom Elite. Donde *w_b* (A) y *w_b* (B) es la anchura de pico en la base de dos picos adyacentes A y B, *t_R* (A) y *t_R* (B) es el tiempo de retención de dos picos adyacentes A y B, *t_M* es el tiempo muerto (0,482 min), es decir, el tiempo requerido para eluir un compuesto que no es retenido por la fase estacionaria y *t'_R* el tiempo de retención ajustado, es decir, el tiempo de elución de un pico menos el tiempo muerto (*t'_R* = *t_R* - *t_M*).

$$\mathbf{a} \quad R_S = \frac{2 (t_{R(B)} - t_{R(A)})}{W_{b(A)} + W_{b(B)}} \quad \mathbf{b} \quad K = \frac{t'_R}{t_M} \quad \mathbf{c} \quad \alpha = \frac{t'_{R(B)}}{t'_{R(A)}} = \frac{K(B)}{K(A)}$$

Ecuación 2. a) Cálculo de la resolución cromatográfica, b) cálculo del factor de retención, c) cálculo de la separación cromatográfica.

La anchura de pico en la base, el tiempo de retención y el tiempo muerto se obtuvieron mediante el Software Empower™ 3 (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, Estados Unidos).

4.7. Análisis de datos

Debido a la gran cantidad de datos fue necesario la aplicación de técnicas quimiométricas para organizar los resultados de forma efectiva. Concretamente, se



usaron las siguientes técnicas quimiométricas no supervisadas o exploratorias: análisis de clúster (CA), empleando tanto el sistema de dendogramas como el de *k*-means, y el análisis de componentes principales (PCA). Para CA, se ha utilizado como método de agrupación en clústeres el *método de Ward* y como distancia la *distancia euclidiana al cuadrado*. Para la aplicación de ambos análisis se utilizó el paquete estadístico Unscramble (version 10.1, Camo Software AS, Oslo, Noruega).

5. Resultados y Discusión

5.1. Selección de las condiciones cromatográficas

Una vez conocida la importancia de los compuestos fenólicos y su presencia elevada en muestras de uvas, surge la necesidad de ser capaces de identificar y cuantificar estos compuestos en las muestras de manera sencilla e inequívoca. Por ello, se plantea como objetivo en este trabajo desarrollar un método que permita la separación de una amplia gama de compuestos fenólicos y que supla los inconvenientes de los ya existentes: tiempos largos de análisis, dificultad de identificación de los compuestos de interés en matrices complejas como son las uvas, análisis de un gran número de compuestos simultáneamente, etc. Para ello, se parte de un método anteriormente desarrollado por el grupo de Investigación Químico-Analítica en Vitivinicultura y Agroalimentación (AGR122) pero empleado para el análisis de un menor de compuestos.

El criterio para seleccionar la mejor separación cromatográfica se basó en conseguir la mayor resolución posible de los picos que presentaban dificultad en su separación. Concretamente, el ácido cafeico, el ácido vainílico y el ácido clorogénico, con tiempos de retención 3,834 min, 3,951 min y 4,112 min respectivamente, mostraban dificultad en su separación. De igual manera, la quercetina 3-*O*-galactosido, la rutina y la quercetina 3-*O*-glucosido, con tiempos de retención, 7,542 min, 7,585 min y 7,638 min respectivamente, bajo determinadas condiciones cromatográficas, se solapaban dando lugar únicamente a dos picos lo que no permitía su cuantificación y análisis. La búsqueda de las condiciones cromatográficas más adecuadas, pretendía obtener unos picos cromatográficos bien resueltos, fácilmente integrables y con tiempos de separación y presión de columna no excesivamente elevados.⁶⁰



5.1.1. Fase móvil

Para la selección de la fase móvil se hicieron previamente una serie de pruebas estudiando como afectaba a la separación cromatográfica el empleo de metanol y acetonitrilo como disolvente B. El acetonitrilo y el metanol son los disolventes más empleados como fase estacionaria en la CL de fase reversa. Aunque ambos proporcionaron buenos resultados, se seleccionó finalmente el acetonitrilo. Esto es debido a la menor viscosidad que presenta este disolvente en comparación con el metanol, lo que genera presiones más bajas permitiendo a su vez poder trabajar con flujos más elevados y acortar el tiempo de análisis.⁶¹ Además, el acetonitrilo presenta alta sensibilidad a longitudes de onda UV cortas, reduciendo el ruido propio de emplear un detector UV-vis.⁶²

5.1.2. Gradiente de separación

Una vez seleccionado el disolvente con el que se iba trabajar, el siguiente paso fue encontrar el gradiente que proporcionara la mejor separación. Para ello, se llevaron a cabo varios experimentos de prueba y error. El primer gradiente que proporcionó unos resultados aceptables para la separación de los 27 compuestos fenólicos fue el siguiente: 1 min, 0% B; 3 min, 5% B; 4 min, 10% B; 4,5 min, 10% B; 5 min, 20% B; 7 min, 20% B; 8 min, 30% B; 9 min, 100% B; 12 min, 100% B; 13 min, 0% B. El cromatograma obtenido se adjunta en el Anexo 1a. Con este gradiente, de los 26 compuestos fenólicos de interés identificados en PDA, únicamente se identifican 23, no siendo posible la identificación de la quercetina 3-*O*-galactosido, rutina y quercetina 3-*O*-glucósido ya que al aparecer únicamente dos picos a ese tiempo y presentar espectros iguales, no es posible concluir con total seguridad cuál de los tres compuestos no aparece o si dos de ellos se han solapado en un único pico de mayor área. No obstante, el resto de compuestos no presentaron una mala separación y el tiempo de retención del compuesto menos polar fue inferior a 9 min. A partir de este gradiente y pasando por diferentes gradientes de prueba, se llegó al gradiente de elución que finalmente se seleccionó como método cromatográfico para la separación de los 27 compuestos fenólicos de interés: 1 min, 0% B; 4 min, 5% B; 6 min, 10% B; 7 min, 20% B; 7,2 min, 20%; 7,5 min, 40% B; 8 min, 45 % B; 8,5 min, 50% B; 9 min, 100% B; 12 min, 100% B; 13 min, 0% B. El cromatograma obtenido se adjunta en el Anexo 1b. Este gradiente proporciona



una buena separación de todos los compuestos, evitando solapamiento entre aquellos compuestos que con los gradientes anteriores no se resolvían correctamente. Además, consigue que la separación tenga lugar en un tiempo inferior a 9 minutos. Todos los experimentos se realizaron a una temperatura de columna de 55 °C y un flujo de disolvente de 0,6 mL/min.

5.1.3. Temperatura de la columna

El siguiente paso fue estudiar el efecto que la temperatura de la columna provocaba en la separación de los compuestos fenólicos, es decir, analizar como distintas temperaturas influían en los tiempos de retención y resolución de los compuestos. Concretamente, con los disolventes y el gradiente de separación más óptimo seleccionado, se llevó a cabo una prueba inicial con las siguientes temperaturas de columna: 25 °C, 35 °C, 45 °C y 55 °C, obteniendo unas mejores separaciones a temperaturas superiores. Por ello, una vez comprobado que el método trabajaba mejor a temperaturas altas, se llevaron a cabo varias separaciones con la columna equilibrada a las siguientes temperaturas: 43 °C, 47 °C, 50 °C, 53 °C y 56 °C. Todos los cromatogramas obtenidos se encuentran en el Anexo 2. A partir de los resultados, se puede concluir que a medida que aumenta la temperatura de la columna se produce también una mejora en la separación. Las temperaturas inferiores, 43 °C y 47 °C, dan lugar a una mala separación del ácido cafeico, vainílico y clorogénico, pues en la zona donde deberían aparecer tres picos aparecen únicamente dos. Estas temperaturas dan lugar también a una mala separación de la quercetina 3-*O*-galactósido, rutina y quercetina 3-*O*-glucósido, apareciendo de igual manera únicamente dos picos en la zona correspondiente a estos tres compuestos (Anexo 2a y 2b). Con respecto a las temperaturas superiores, 53 °C y 56 °C, el solapamiento de los ácidos fenólicos no tiene lugar, separándose correctamente los tres compuestos (Anexo 2c y 2d). El hecho de elegir finalmente 56 °C como temperatura óptima de columna se debe a que solo cuando la columna está equilibrada a dicha temperatura, se consigue la correcta separación de los tres derivados de quercetina. Es importante tener en cuenta que a medida que aumenta la temperatura de la columna, la viscosidad de la fase móvil disminuye, lo cual reduce la presión de la columna, uno de los problemas más comunes encontrados en los análisis de UHPLC.⁶³



5.1.4. Flujo de separación

Una vez seleccionada la temperatura óptima, al ser esta elevada y reducir así la presión de la columna, se puede trabajar con flujos superiores.⁴⁹ Por tanto, trabajar a 56 °C, presenta también de manera indirecta la ventaja de acortar el tiempo de análisis, pues flujos mayores dan lugar a tiempos de análisis más cortos.

Partiendo de un flujo de disolventes inicial de 0,6 mL/min, se llevaron a cabo varios experimentos aumentando el flujo y observando los resultados. Concretamente, se probaron los siguientes flujos de disolventes: 0,6 mL/min, 0,65 mL/min, 0,7 mL/min y 0,75 mL/min. En el Anexo 3, se recogen los cromatogramas obtenidos a los diferentes flujos. Se puede observar como con ninguno de ellos se consigue la perfecta resolución y cuantificación de todos los picos de los analitos, lo cual es frecuente en muestras complejas con un gran número de componentes. Mientras que con los flujos 0,7 y 0,75 mL/min se consigue una mejor separación de la quercetina 3-*O*-galactósido, rutina y quercetina 3-*O*-glucósido, los picos correspondientes a la epicatequina y el kaempferol no aparecen con un flujo de 0,75 mL/min, y aparecen débilmente resueltos con un flujo de 0,7 mL/min (Anexo 3a y Anexo 3b). Por otro lado, mientras que con los flujos 0,6 y 0,65 mL/min la separación de todos los picos es posible, la quercetina 3-*O*-galactósido, rutina y quercetina 3-*O*-glucósido aparecen peor resueltas (Anexo 3c y 3d). Finalmente, teniendo en cuenta las ventajas y desventajas de los diferentes flujos, se decidió trabajar con los flujos inferiores, pues aunque la resolución de los tres derivados de quercetina es algo inferior, permite cuantificar todos los compuestos. Entre 0,6 mL/min y 0,65 mL/min, se optó por trabajar con un flujo de disolventes de 0,6 mL/min, pues ofrece una pequeña mejora en la resolución de dichos derivados, sin suponer casi ningún aumento en el tiempo de separación final.

5.2. Características y validación del método cromatográfico

Finalmente, se puede concluir que el método cromatográfico finalmente desarrollado es el siguiente: 1 min, 0% B; 4 min, 5% B; 6 min, 10% B; 7 min, 20% B; 7,2 min, 20%; 7,5 min, 40% B; 8 min, 45% B; 8,5 min, 50% B; 9 min, 100% B; 12 min, 100% B; 13 min, 0% B. El flujo de disolventes seleccionado fue 0,6 mL/min, la temperatura de la columna 56 °C y el volumen de inyección 3 µL. Con estas condiciones se consigue el mejor balance



entre una correcta separación de los 27 compuestos fenólicos de interés y tiempo de análisis. El tiempo total de análisis, incluyendo el regreso a la condiciones iniciales de análisis (0% B) y el reequilibrado, es de 13 min, mientras que la separación de los compuestos tiene lugar en un tiempo inferior a 9 min. Concretamente, el compuesto menos polar, la miricetina, presenta un tiempo de retención de 8,578 min. En la Figura 6 se puede observar el cromatograma que se obtiene con el método desarrollado.

Una vez desarrollado el método cromatográfico se llevó a cabo su validación. Para dicha validación se tuvo en cuenta las recomendaciones proporcionadas en la guía ICH Q2 (R1).⁵⁴ Concretamente, se evaluaron las siguientes características analíticas: linealidad, límite de detección y cuantificación, precisión, mediante la repetibilidad y precisión intermedia, y robustez. Además de la validación del método, se estudiaron varias propiedades cromatográficas: resolución (R_s), selectividad (α) y factor de retención (K). Hay que tener en cuenta que aunque, como se indicó en la sección “materiales y métodos”, 8 de los 27 compuestos fenólicos se analizan mediante el detector de fluorescencia, al separarse todos adecuadamente mediante DAD, excepto la procianidina A₂, se consideró interesante realizar su validación tanto para su detección por FLR como por DAD.

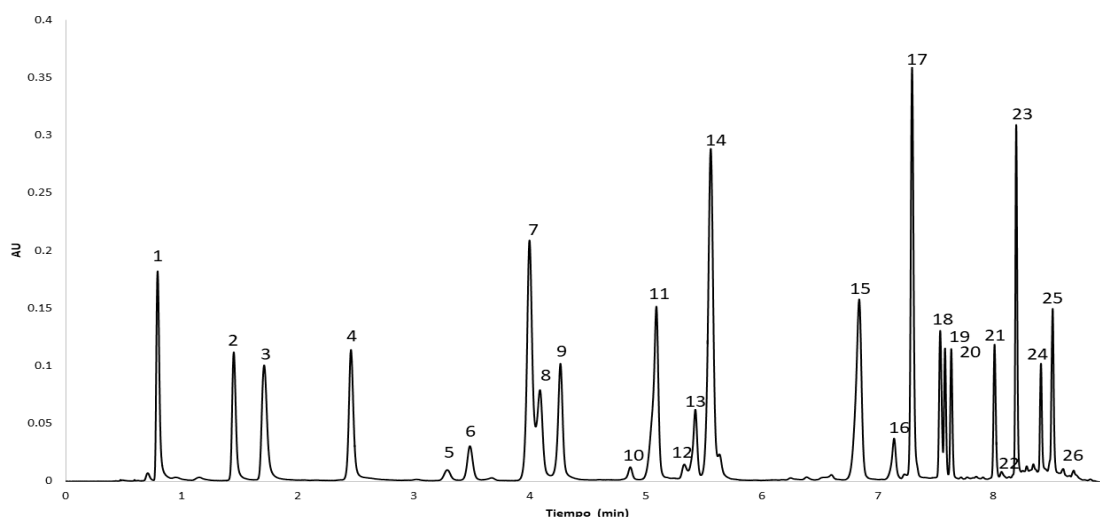


Figura 6. Cromatograma de compuestos fenólicos mediante UHPLC-DAD ($\lambda = 280$ nm). 1- ácido gálico, 2- ácido protocatéquico, 3- ácido caftárico, 4- ácido *p*-hidroxibenzoico, 5- procianidina B₁, 6- catequina, 7- ácido cafeico, 8- ácido vainillico, 9- ácido clorogénico, 10- procianidina B₂, 11- ácido siríntrico, 12- EGCG, 13- epicatequina, 14- ácido *p*-cumárico, 15- ácido ferúlico, 16- ECG, 17- *t*-piceido, 18- quercetina 3-*O*-galactósido, 19- rutina, 20- quercetina 3-*O*-glucósido, 21- quercetina 3-rhamnosido, 22- kaempferol, 23- *t*-resveratrol, 24- quercetina, 25- ϵ -viniferina y 26- miricetina.

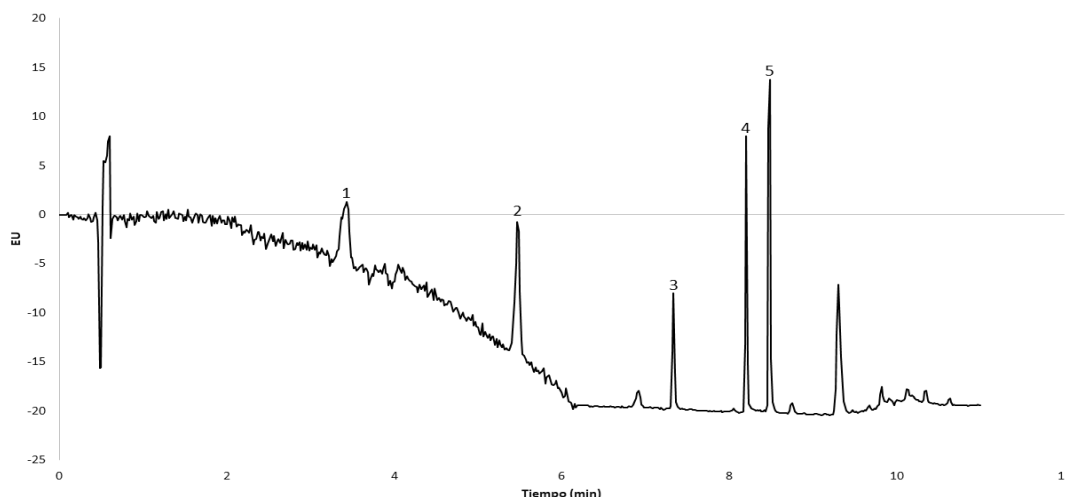


Figura 7. Cromatograma de compuestos fenólicos mediante UHPLC-FLR (λ_{ex} 290 nm y λ_{em} 310; λ_{ex} 310 nm y λ_{em} 403 nm). 1-catequina, 2-epicatequina, 3-t-piceido, 4-t-resveratrol, 5- ϵ -viniferina

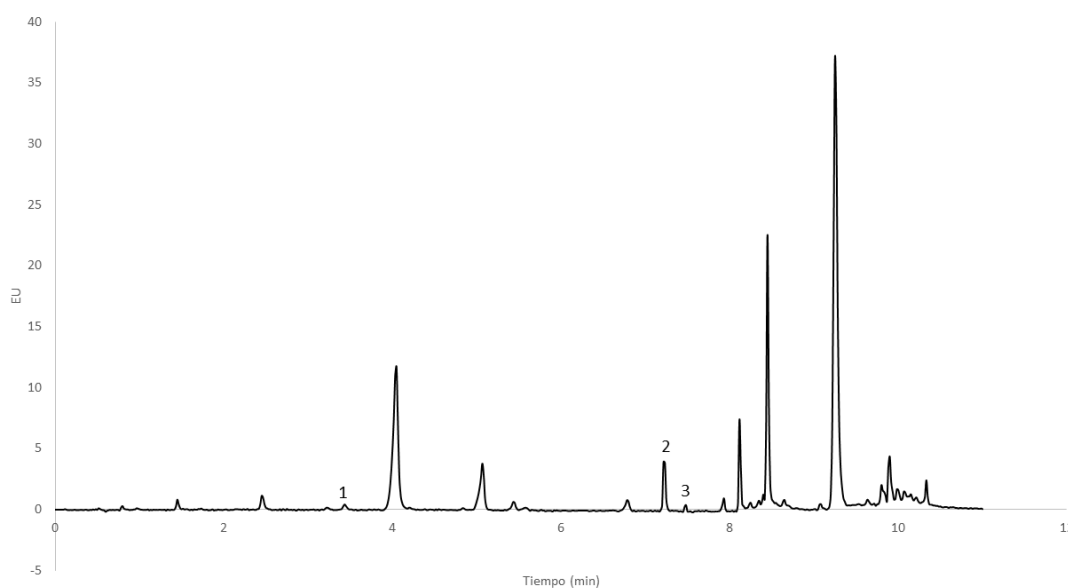


Figura 8. Cromatograma de compuestos fenólicos mediante UHPLC-FLR (λ_{ex} 250 nm y λ_{em} 395 nm). 1-procianidina B₁, 2-ECG, 3-procianidina A₂.

5.2.1. Linealidad

La linealidad del método cromatográfico desarrollado fue confirmada mediante los coeficientes de determinación (R^2) de las curvas de calibrado obtenidas para los compuestos fenólicos. Estos coeficientes, (Anexo 4), muestran valores iguales o superiores a 0,9990 por lo que se puede afirmar que el método desarrollado muestra



una buena linealidad en el rango estudiado para todos los compuestos y ambos detectores, al ser los valores muy próximos a uno.

5.2.2. Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) del método cromatográfico desarrollado fueron estimados mediante la desviación estándar del blanco, y la pendiente de la curva de calibrado. En el Anexo 4 aparecen recogidos estos valores. Tanto los valores de LOD como los de LOQ son bastante bajos, del orden de los ppm, lo cual coincide con resultados encontrados en la bibliografía para estos compuestos fenólicos.⁵¹ Mediante DAD, los límites de detección y cuantificación más bajos, 0,0116 ppm y 0,0313 ppm, fueron obtenidos para el *t*-resveratrol, mientras que los límites más elevados, 0,5304 ppm y 1,7681 ppm fueron obtenidos para la EGCG. Además, tal y como se comentó anteriormente los compuestos analizados haciendo uso del detector de fluorescencia presentan LOD y LOQ más bajos que cuando son analizados mediante DAD. Esto es sobre todo interesante para el caso de la epicatequina y la catequina, que presentan un LOQ en DAD superior al del resto de compuestos, el cual se reduce bastante cuando los estudiamos por fluorescencia, permitiéndonos cuantificar esos compuestos aunque estén presentes en muy bajas concentraciones en las uvas.

5.2.3. Precisión

La repetibilidad y precisión intermedia del método cromatográfico desarrollado fue establecida considerando el tiempo de retención, área de pico, anchura de pico, altura de pico y resolución de pico. Los resultados obtenidos aparecen recogidos en el Anexo 5. Todos los CV obtenidos son inferiores a 5%, pudiéndose afirmar por tanto que el método cromatográfico desarrollado presenta una buena resolución para todos los compuestos y mediante ambos detectores, ya que suele considerarse un 10% como máximo error permitido. Concretamente, el tiempo de retención es el parámetro que presenta una mayor precisión, con unos coeficientes inferiores a 0,4% y a 1,7% para la repetibilidad y precisión intermedia, respectivamente.

5.2.4. Robustez

La robustez del método cromatográfico desarrollado se evaluó realizando variaciones de un 5% en la temperatura de la columna (51, 53, 56 °C), flujo de disolventes (0,57, 0,6



y 0,63 mL/min) y volumen de inyección (2,8, 3 y 3,2 μ L). Al llevar a cabo el estudio de un gran número de compuestos fenólicos, algunos con polaridad similar, pequeñas alteraciones en los parámetros cromatográficos pueden provocar variaciones en los resultados obtenidos. Esto se puede comprobar en los resultados mostrados en el Anexo 6, teniendo en cuenta que distintas letras en la misma fila significa que hay diferencias significativas según la prueba-*t* suponiendo varianzas equivalentes (p -valor < 0,05). Variaciones en la temperatura de la columna, el volumen de inyección o el flujo propician variaciones en el área, tiempo de retención y resolución de los picos correspondientes a cada uno de los compuestos analizados. Esto indica que el método desarrollado es muy sensible y que requiere de unas condiciones concretas para obtener las buenas resoluciones, que se ha demostrado que es capaz de alcanzar. Por tanto, es importante *a priori* determinar y validar cuáles son las mejores condiciones para el método para *a posteriori*, realizar buenos equilibrados y acondicionamientos del equipo.

Aun así, de los parámetros estudiados, el método muestra ser algo más robusto frente a variaciones en el volumen de inyección. Con respecto a los otros parámetros, flujo y temperatura, el método muestra diferencias significativas tanto para los valores de tiempo de retención como de área. La resolución, aunque también muestra diferencias significativas para muchos de los compuestos, es la característica que menos se alterada frente a los cambios en los parámetros. De especial interés son el ácido cafeico y ácido el vainílico, y la quercetina 3-*O*-galactósido y la rutina, ya que temperaturas de columna inferiores a 56 °C propician que cada par de compuestos, con tiempo de retención muy similares, se solapen en un único pico cuando se analizan mediante DAD.

5.2.5. Propiedades cromatográficas

Existen varias propiedades cromatográficas, cuyos resultados indican el buen o mal rendimiento cromatográfico. Concretamente, el Anexo 7 recoge las propiedades estudiadas: resolución, selectividad y factor de retención, así como el tiempo de retención y el ancho de pico, necesario para su cálculo.

Cuando se separan varios picos, el objetivo general suele ser alcanzar valores de resolución al menos superiores a 1,5.⁶⁴ Valores de resolución de 1 implican un solapamiento del 4% entre los dos picos adyacentes, y valores de 1,5 un solapamiento



de tan solo 0,3%. Valores inferiores a 1 generan separaciones más pobres. Con respecto a las separaciones realizadas en DAD, se obtienen separaciones óptimas con valores de resolución superiores a 1,5 y 1 para todos los compuestos excepto para los siguientes pares de compuestos, que presentan separaciones más pobres con valores de resolución ligeramente inferiores a 1: ácido caftárico-ácido protocatequico, ácido vainillico-ácido cafeico, ECG-ácido siríngico, quercetina 3-*O*-galactósido-*t*-piceido, rutina- quercetina 3-*O*-galactósido, quercetina 3-*O*-glucósido-rutina, *t*-resveratrol-kaempferol y ϵ -viniferina-quercetina. Con respecto a las separaciones realizadas con el detector de fluorescencia todas las resoluciones son bastante altas, al analizarse compuestos con tiempos de retención muy diferentes.

Con respecto al factor de retención (*K*), el objetivo es obtener valores ni excesivamente elevados ni excesivamente bajos. Concretamente, valores de factor de retención entre 1 y 10 ($1 < k < 10$) suele ser el objetivo deseado. Aunque en ocasiones, el rango puede ampliarse a $0,5 < k < 20$.⁶⁵ En nuestro caso concreto, todos los compuestos fenólicos presentan valores de retención comprendidos entre 0,5 y 20 para ambos detectores.

Por último, el estudio de la selectividad es también importante, pues mejoras en la selectividad pueden generar mejoras en la resolución y/o disminución del tiempo de análisis. Concretamente, valores de selectividad entre 1 y 2 ($1 < \alpha < 2$) suele ser el objetivo deseado. Todos los compuestos fenólicos presentan valores de selectividad comprendidos en ese intervalo para ambos detectores, a excepción del ácido protocatéquico (DAD) cuya selectividad es 3,04 y la ECG (FLR) cuya selectividad es 2,42.

5.3. Aplicación a muestras reales

Tras el desarrollo y validación del método de separación, se procedió a aplicarlo a un conjunto de muestras dentro del proyecto INIA "Identificación de regiones implicadas en la acumulación de compuestos saludables en el genoma de la uva de mesa (RTA2014-00083-C03-03)". Se aplicó a un total de 210 muestras de diferentes variedades de uva de mesa, vinificación y silvestres, teniendo con ello el más amplio ámbito de aplicación posible del nuevo método desarrollado. La aplicación permitió identificar y cuantificar en la mayoría de los casos, 17 compuestos fenólicos. Concretamente, haciendo uso de DAD, tanto mediante librería como empleando patrones, se pudo identificar en las



muestras los siguientes compuestos fenólicos: ácido gálico, ácido protocatéquico, ácido caftárico, procianidina B₂, ácido cafeico, quercetina 3-*O*-galactósido, quercetina 3-*O*-glucósido, quercetina 3-*O*-rhamnósido y kaempferol. Paralelamente, haciendo uso del detector de FLR se identificaron los siguientes compuestos fenólicos: procianidina B₁, ECG, procianidina A₂, catequina, epicatequina, *t*-piceido, *t*-resveratrol y ϵ -viniferina. Los cromatogramas obtenidos se recogen en el Anexo 8.

Los resultados producidos se aprovecharán dentro del citado proyecto para la caracterización de las variedades de uva estudiadas con el fin indicado en los objetivos del mismo.

Dentro de este Trabajo Fin de Máster, se ha realizado un estudio sistemático de los resultados empleando para ellos técnicas quimiométricas, que permiten extraer información de forma más efectiva, dado el alto número de datos generados (210 muestras x 17 compuestos fenólicos).

En primer lugar, se decidió emplear una técnica no supervisada para el análisis de los resultados. Concretamente se hizo uso del análisis de clúster (CA), empleando tanto el sistema de dendogramas como el de *k*-means. Con posterioridad, se empleó otra técnica no supervisada, el análisis de componentes principales (PCA), para organizar la información obtenida de forma efectiva.

Para ambos estudios en primer lugar se realizó una normalización de los resultados. Esto es importante pues la no normalización provoca que aquellas variables que se mueven en un rango mayor, pesen más en la agrupación, sesgando el análisis. El efecto de la normalización se puede observar en la comparación de los dos dendogramas adjuntados, Figura 7 y Figura 8.

En este caso concreto, los componentes analizados mediante el detector de fluorescencia tenían siempre valores de 2-5 órdenes de magnitud mayores y producían resultados completamente condicionados. Hay que aclarar en este punto, que se ha realizado la cuantificación de todos los componentes empleando curvas de calibrado externas, pero que para el estudio quimiométrico se han empleado valores de áreas, disminuyendo así los errores. Al presentar dos de los compuestos fenólicos, catequina y epicatequina, valores muy grandes de área, el dendrograma obtenido (Figura 7) muestra



que estos compuestos fenólicos se asemejan mucho a la variable que representa el total de compuestos fenólicos y se alejan de los demás componentes.

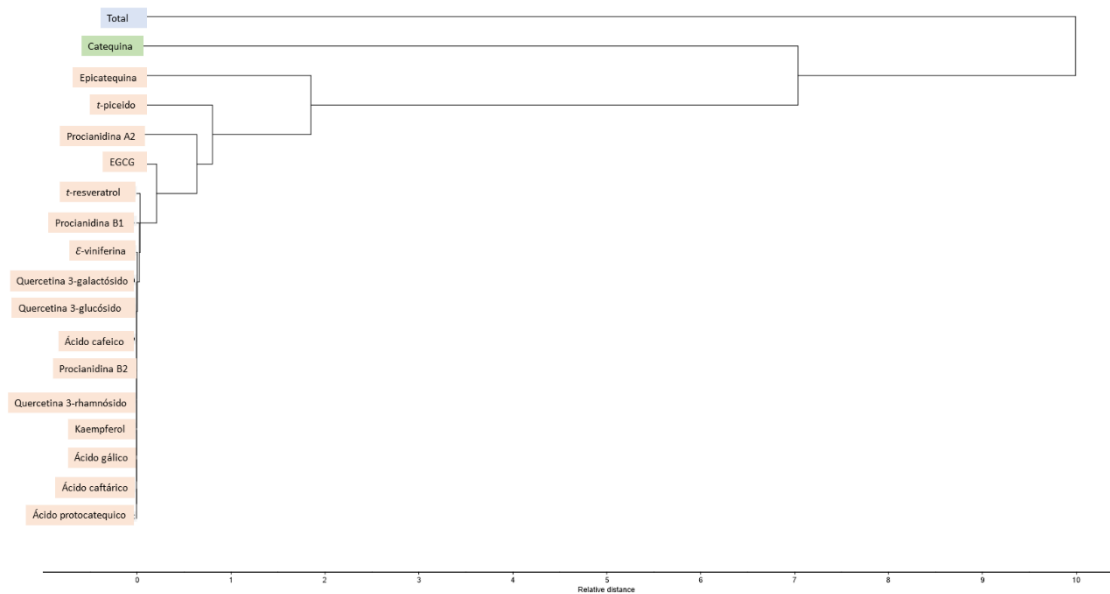


Figura 7. Dendrograma no normalizado de variables obtenido mediante el CA.

Una vez normalizados los resultados, a partir del dendrograma de variables obtenido (Figura 8) se pueden sacar varias conclusiones. El dendrograma muestra que hay una agrupación bastante interesante de los polifenoles, independientemente de la variedad de uva. Concretamente, se pueden apreciar 2 clúster diferentes:

- Clúster 1. En este primer clúster se agrupan de manera separada los flavonoles identificados en las uvas (quercetina 3-*O*-rhamnósido, kaempferol, quercetina 3-*O*-glucósido y quercetina 3-*O*-galactósido) y 2 de los 4 ácidos fenólicos identificados en las uvas (ácido gálico y ácido protocatéquico).
- Clúster 2. En este segundo clúster se agrupan el resto de compuestos identificados en la uva. A excepción de algunos compuestos, se puede apreciar como en el clúster aparecen adecuadamente agrupados los compuestos por familias, en primer lugar los estilbenos (*E*-viniferina y *t*-resveratrol) y a continuación los flavanoles (procianidina B₁, procianidina B₂ y EGCG). Además, las catequinas aparecen todas formando un grupo compacto.

Como un primer estudio, el cual debería profundizarse posteriormente, sobre todo en relación con la explicación de la biosíntesis de cada una de las familias de polifenoles, se



puede concluir que independientemente de la variedad, la composición dentro de una familia de compuestos está relacionada. Esto es interesante, porque si una variedad

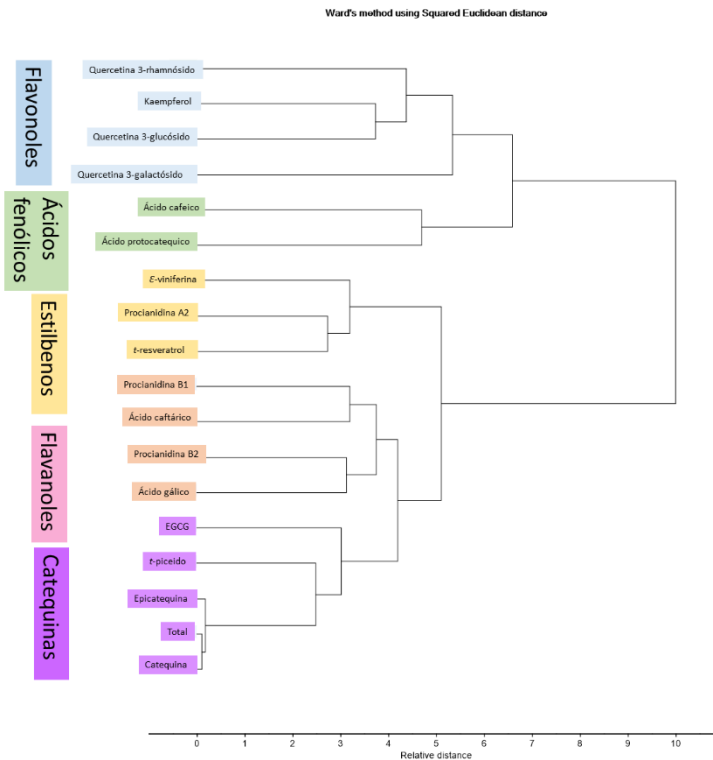


Figura 8. Dendrograma normalizado de variables obtenido mediante el CA.

presenta por ejemplo el doble de concentración en quercetina 3-*O*-rhamnósido que otra variedad, aproximadamente presentaría también el doble de quercetina 3-*O*-galactósido. Además, tenemos que tener en cuenta, que las condiciones de cultivo, la localización o cualquier variable que afecta a la planta, podrá en todo caso modificar las concentraciones de las diferentes familias, pero parece que no contribuirán a producir cambios individuales dentro de los componentes de cada familia de compuestos fenólicos. Los dos compuestos particulares que parecen no seguir la tendencia son un glucósido (*t*-piceido) y un éster (ácido caftárico) cuyo niveles pueden estar condicionados por los valores de pH, además de por el tipo de variedad.

Mediante el análisis de PCA y los Gráficos de Componentes Principales (Figura 9) se puede confirmar lo anteriormente dicho. Se puede observar como las variables que más contribuyen al componente 1 (PC1) son la quercetina 3-*O*-rhamnósido, kaempferol, quercetina 3-*O*-glucósido y quercetina 3-*O*-galactósido, por estar las variables muy desplazadas hacia la derecha y nada en el eje vertical. Por otro lado, la PC2, está muy



condicionada por el ácido protocatéquico, ácido gálico y ácido cafeico. Los estilbenos y las catequinas que aparecen sin un agrupamiento concreto en el espacio representado, contribuyen a la PC3 que aun presenta un valor propio grande (eigenvalor). Esto se puede observar en la Tabla adjuntada en el Anexo 8, donde se muestran las cargas (loadings) de cada variable para cada uno de los componentes. Se puede concluir por tanto que la PC1 está muy condicionada por los flavonoles, la PC2 por los ácidos fenólicos y la PC3 por los estilbenos.

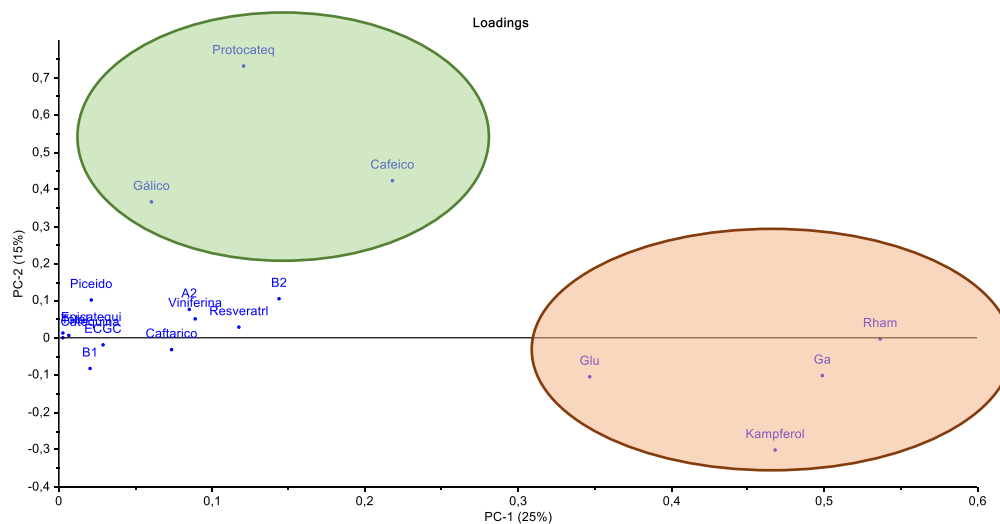


Figura 9. Gráfico de Componentes Principales obtenido mediante el análisis PCA.

Todo esto indica que la variedad condiciona de forma específica la formación de familias. Siempre se ha sabido que la variedad influye en el perfil polifenólico de las uvas, pero se ha pensado que unas variedades presentan muchos compuestos fenólicos y otras menos. Los resultados aquí presentados muestran que las posibilidades son diversas pero están agrupadas por familia, es decir, una variedad puede presentar muchos flavonoides, pocos ácidos fenólicos y muchos estilbenos, o pocos flavonoides y muchos ácidos fenólicos y estilbenos, etc.

Por último, volviendo al análisis de clúster, pero en este caso aplicado sobre las muestras, no sobre los polifenoles, se ha realizado el estudio también sobre las 210 muestras. Para ello, se ha hecho uso del método de agrupamiento *k*-means, que debido a la gran cantidad de muestras ofrece unos resultados más visuales que el análisis empleando dendogramas. Se han seleccionado *a priori* un total de 10 clases, tomando como base de partida los dendogramas obtenidos, y una vez obtenidas las 10 clases, se ha procedido a revisar los valores medios de las muestras que componen cada clase. La



información de qué variedades de uva conforman cada clase, así como del color y tipo aparece recogida en el Anexo 9. Con ello, en lugar de visualizar los resultados del análisis de clúster, dado el alto número de muestras, se ha preferido mostrar los resultados de la caracterización de las clases elaboradas en el citado análisis. Para mostrar estos resultados, se han usado diagramas de barras (Figura 10 y Figura 11) con los valores medios de diferentes tipos de compuestos.

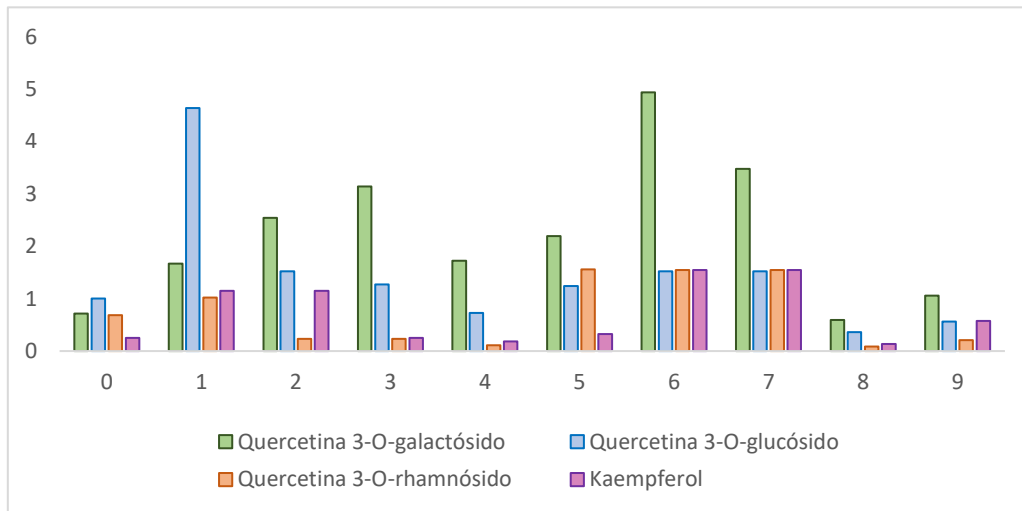


Figura 10. Diagrama de barra con valores medios de flavonoles.

Teniendo en cuenta el agrupamiento en función de los flavonoides se puede observar como la clases 6 y 7 tienen un contenido bastante alto de todos los flavonoles especialmente de la quercetina 3-O-galactósido, siendo únicamente superado su contenido en quercetina 3-o-glucósido por la clase 1. Las clases 6, 7, 1 y 2 son las que presentan mayor cantidad de kaempferol, siendo algo inferior en estas dos últimas clases. La clase 8 se caracteriza porque presenta muy baja cantidad de todos los flavonoles.

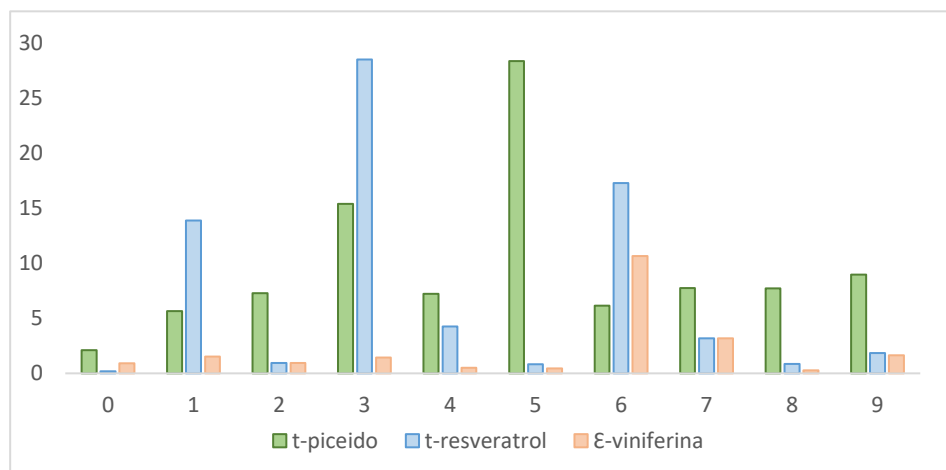


Figura 11. Diagrama de barra con valores medios de estilbenos.



Teniendo en cuenta el agrupamiento en función de los estilbenos se puede observar como la clase 3 es la que tiene más cantidad de estilbenos, principalmente de *t*-piceido y de *t*-resveratrol. La clase 5 se caracteriza porque prácticamente sólo tiene *t*-piceido, al igual que las clases 8 y 9 pero con valores mucho más bajos estos últimos. La viniferina es el flavonoide minoritario en todas las clases, únicamente en la clase 6 muestra valores más elevados. Además, la clase 0 es la que presenta menor cantidad de todos los estilbenos.

Podemos afirmar que, a raíz de los resultados obtenidos, los compuestos fenólicos permiten clasificar las uvas. Esto es de gran interés en particular para el proyecto que se desarrolla y en general para la enología, puesto que habiendo caracterizado las variedades de uva en diferentes grupos según su composición fenólica, se podrá abordar su uso en vinificación o en consumo de mesa, y en su caso seleccionar las uvas con mejores características para la elaboración de zumos y vinos con propiedades interesantes tanto desde el punto de vista organoléptico como para sus implicaciones y efectos sobre la salud.

6. Conclusiones

Se ha desarrollado un método rápido y reproducible para la separación de compuestos fenólicos en uva haciendo uso de la cromatografía líquida de ultra eficacia (UHPLC-DAD-FLR). Concretamente, se ha desarrollado un método cromatográfico capaz de separar 27 compuestos fenólicos distintos con una temperatura de columna de 56 °C y un flujo de disolventes de 0,6 mL/min. Estas condiciones son necesarias para que la separación y análisis de los 27 compuestos se lleve a cabo en un tiempo inferior a 9 minutos y con una alta repetibilidad y precisión intermedia (CV < 5%) para la anchura, altura, área y resolución de pico. Además, el método fue aplicado con éxito a distintas variedades de uva, permitiendo analizar y cuantificar en las muestras 17 compuestos fenólicos. Los resultados obtenidos demuestran que los compuestos fenólicos permiten clasificar las uvas. Esto es de gran interés para la enología, puesto que permite seleccionar qué uvas presentan las mejores características para la elaboración de vinos con propiedades organolépticas interesantes y buenos efectos para la salud. Además, los resultados también demuestran que indistintamente de la variedad, los compuestos fenólicos se clasifican en familias con características semejantes. Se puede concluir por tanto que la



combinación de las mejoras cromatográficas que ofrece UHPLC con las condiciones cromatográficas optimizadas, da lugar a un incremento en el rendimiento cromatográfico en comparación con los métodos convencionales, presentando así un gran potencial para el análisis de compuestos fenólicos en uvas y probablemente en otras matrices naturales.

7. Plan de difusión

Para la explotación de los resultados obtenidos, se desea emplear los siguientes medios con el fin de difundir el trabajo realizado: contribución en congresos científicos, participación en jornadas de investigación, publicación en revistas científicas de alto índice de impacto y divulgación en redes sociales y portales científicos. Además, es necesario destacar que este trabajo se engloba dentro del proyecto INIA “Identificación de regiones implicadas en la acumulación de compuestos saludables en el genoma de la uva de mesa (RTA2014-00083-C03-03)”.

Con respecto a la participación en congresos científicos, parte del trabajo realizado se presentó en el Congreso Internacional Macrowine 2018 celebrado en Zaragoza del 28 al 31 de mayo de 2018. Concretamente, los resultados se presentaron en formato póster, titulado **“Bioactive Polyphenols Analysis In Grapes By Microwave-Assisted Extraction and Liquid Chromatography”**. De igual manera, parte del trabajo se presentará también en la XVI reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica (GRASEQA 2018), que se celebrará en Granada del 4 al 5 de Octubre de 2018. Los resultados han sido aceptados para su presentación en formato póster titulado **“Optimización y validación de un método de análisis de compuestos fenólicos en uvas mediante cromatografía líquida de ultra-eficacia (UHPLC-DAD-FI)”**. Posteriormente, se presentarán comunicaciones en formato póster u oral en el congreso CYTA (Ciencia y Tecnología de los Alimentos) y en el congreso Euroanalysis, que se celebrará en 2019 en León y Turquía respectivamente.

Con respecto a “Jornadas de presentación de resultados de investigación”, se desea participar en alguna de ellas mediante una comunicación oral donde se puede transmitir los resultados más relevantes del trabajo realizado. Una de ellas, serían las organizadas por el IVAGRO.



Por último, se desean publicar los resultados obtenidos en revistas internaciones de gran índice de impacto dentro del área de estudio, es decir, en revistas que acojan trabajos sobre desarrollos de métodos enfocados en matrices alimentarias. Dentro de esta temática podemos destacar la revista Food Chemistry, que publica artículos centrados en los avances en la Química y Bioquímica de alimentos, pero también en los métodos analíticos utilizados para su investigación. Otra posible revista, sería Talanta que se centra en todas las ramas de la química analítica pura y aplicada. Ambas revistas se sitúan en 2017 en Q1. El análisis de la clasificación de las revistas se realizó mediante la herramienta InCites del Journal Citations Report.

Por último, los resultados más relevantes se comunicaran al Servicio Nacional de Información y Noticias Científicas (<http://www.agenciasinc.es>) y a los servicios de prensa del IVAGRO. Así mismo, todos los conocimientos y avances realizados estarán disponibles en la página oficial del IVAGRO (<http://ivagro.uca.es/>) y del IFAPA (<https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/web/>) y se difundirán haciendo uso de redes sociales de ámbito científico y divulgativo como ResearchGate o Twitter.

8. Bibliografía

1. Pantelić MM, Dabić Zagorac D, Davidović SM, et al. Identification and quantification of phenolic compounds in berry skin, pulp, and seeds in 13 grapevine varieties grown in Serbia. *Food Chem.* 2016;211:243-252.
2. Luo L, Cui Y, Zhang S, Li L, Suo H, Sun B. Detailed phenolic composition of Vidal grape pomace by ultrahigh-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2017;1068-1069:201-209.
3. Garrido J, Borges F. Wine and grape polyphenols - A chemical perspective. *Food Res Int.* 2013;54:1844-1858.
4. Wojdyło A, Samoticha J, Nowicka P, Chmielewska J. Characterisation of (poly)phenolic constituents of two interspecific red hybrids of Rondo and Regent (*Vitis vinifera*) by LC–PDA–ESI-MS QTof. *Food Chem.* 2018;239:94-101.
5. Castillo-mun N, Go S, Garci E, Go MV, Velders AH, Hermosi I. Flavonol 3- O -Glycosides Series of *Vitis vinifera* Cv . Petit Verdot Red Wine Grapes. *J. Agric. Food Chem.* 2009:209-219.
6. Beslic Z, Pantelic M, Dabic D, Todoc S, Natic M, Tesic Z. Effect of vineyard floor



- management on water regime, growth response, yield and fruit quality in Cabernet Sauvignon. *Sci Hortic.* 2015;197:650-656.
7. De Pascali SA, Coletta A, Del Coco L, Basile T, Gambacorta G, Fanizzi FP. Viticultural practice and winemaking effects on metabolic profile of Negroamaro. *Food Chem.* 2014;161:112-119.
 8. Samoticha J, Wojdyło A, Golis T. Phenolic composition, physicochemical properties and antioxidant activity of interspecific hybrids of grapes growing in Poland. *Food Chem.* 2017;215:263-273.
 9. Tian Y, Pугanen A, Alakomi HL, Uusitupa A, Saarela M, Yang B. Antioxidative and antibacterial activities of aqueous ethanol extracts of berries, leaves, and branches of berry plants. *Food Res Int.* 2018;106:291-303.
 10. Montoro P, Tuberoso CIG, Piacente S, et al. Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. *J Pharm Biomed Anal.* 2006;41(5):1614-1619.
 11. De Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:202-226.
 12. Aidi Wannes W, Mhamdi B, Sriti J, et al. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food Chem Toxicol.* 2010;48:1362-1370.
 13. Xi H, Akishita M, Nagai K, et al. Potent free radical scavenger, edaravone, suppresses oxidative stress-induced endothelial damage and early atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2007;191:281-289.
 14. Heath MC. In this issue: Secondary metabolites and plant defence. *Physiol Mol Plant Pathol.* 2002;60:273-274.
 15. Brown JP. A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. *Mutation Research.* 1980;75:243-277.
 16. Figueroa-Espinoza MC, Villeneuve P. Phenolic Acids Enzymatic Lipophilization. *J. Agric.Food Chem.* 2005;53:2779-2787.
 17. Chong J, Poutaraud A, Huguency P. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science.* 2009;51:143-155.
 18. A. Vallverdú-Queralt, A. Medina-Remón, C. Andres-Lacueva RML-R. Changes in phenolic profile and antioxidant activity during production of diced tomatoes. *Food Chem.* 2011;126:1700-1707.
 19. Li Y, Skouroumounis GK, Elsej GM, Taylor DK. Microwave-assistance provides very rapid



- and efficient extraction of grape seed polyphenols. *Food Chem.* 2011;129:570-576.
20. Palacios I, Lozano M, Moro C, et al. Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chem.* 2011;128:674-678.
 21. Tomás-Barberán FA, Gil MI, Cremin P, Waterhouse AL, Hess-Pierce B, Kader AA. HPLC - DAD - ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. *J Agric Food Chem.* 2001;49:4748-4760.
 22. Rojas MC, Brewer MS. Effect of natural antioxidants on oxidative stability of frozen, vacuum-packaged beef and pork. *J Food Qual.* 2008;31:173-188.
 23. Haddadi-Guemghar H, Janel N, Dairou J, Remini H, Madani K. Optimisation of microwave-assisted extraction of prune (*Prunus domestica*) antioxidants by response surface methodology. *Int J Food Sci Technol.* 2014;49:2158-2166.
 24. Granato D, Santos JS, Maciel LG, Nunes DS. Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices. *Trends Anal Chem.* 2016;80:266-279.
 25. Spigno G, De Faveri DM. Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. *J Food Eng.* 2009;93:210-217.
 26. Wen Y, Chen H, Zhou X, et al. Optimization of the microwave-assisted extraction and antioxidant activities of anthocyanins from blackberry using a response surface methodology. *RSC Adv.* 2015;5:19686-19695.
 27. Li H, Deng Z, Wu T, Liu R, Loewen S, Tsao R. Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chem.* 2012;130:928-936.
 28. Liazid A, Guerrero RF, Cantos E, Palma M, Barroso CG. Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chem.* 2011;124:1238-1243.
 29. Bélanger JMR, Jocelyn Paré JR, Sigouin M. Chapter 2 - High performance liquid chromatography (HPLC): Principles and applications. *Tech Instrum Anal Chem.* 1997;18:37-59.
 30. Guillarme D, Nguyen DTT, Rudaz S, Veuthey JL. Recent developments in liquid chromatography-Impact on qualitative and quantitative performance. *J Chromatogr A.* 2007;1149:20-29.
 31. Tistaert C, Dejaegher B, Heyden Y Vander. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: A review. *Anal Chim Acta.* 2011;690:148-161.
 32. Xu QA. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Its Applications.* Wiley. 2013. Hoboken, Nueva Jersey, Estados Unidos.
 33. Riciputi Y, Diaz-de-Cerio E, Akyol H, et al. Establishment of ultrasound-assisted



- extraction of phenolic compounds from industrial potato by-products using response surface methodology. *Food Chem.* 2018;269:258-263.
34. Zhu MT, Huang YS, Wang YL, et al. Comparison of (poly)phenolic compounds and antioxidant properties of pomace extracts from kiwi and grape juice. *Food Chem.* 2019;271:425-432.
 35. Weber N, Schmitzer V, Jakopic J, Stampar F. First fruit in season: seaweed extract and silicon advance organic strawberry (*Fragaria×ananassa Duch.*) fruit formation and yield. *Sci Hort.* 2018;242:103-109.
 36. Aleixandre-Tudo JL, Nieuwoudt H, Olivieri A, Aleixandre JL, du Toit W. Phenolic profiling of grapes, fermenting samples and wines using UV-Visible spectroscopy with chemometrics. *Food Control.* 2018;85:11-22.
 37. Garzón GA, Narváez-Cuenca CE, Vincken JP GH. Polyphenolic composition and antioxidant activity of açai (*Euterpe oleracea Mart.*) from Colombia. *Food Chem.* 2017;217:364-372.
 38. Viacava GE, Roura SI, López-Márquez DM, Berrueta LA, Gallo B, Alonso-Salces RM. Polyphenolic profile of butterhead lettuce cultivar by ultrahigh performance liquid chromatography coupled online to UV-visible spectrophotometry and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Chem.* 2018;260:239-273.
 39. Mena P, Sánchez-Salcedo EM, Tassotti M, Martínez JJ, Hernández F, Del Rio D. Phytochemical evaluation of eight white (*Morus alba L.*) and black (*Morus nigra L.*) mulberry clones grown in Spain based on UHPLC-ESI-MSnmetabolomic profiles. *Food Res Int.* 2016;89:1116-1122.
 40. Flamini R, De Rosso M, Bavaresco L. Study of Grape Polyphenols by Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry (UHPLC/QTOF) and Suspect Screening Analysis. *J Anal Methods Chem.* 2015;2015:1-10.
 41. Regos I, Treutter D. Optimization of a high-performance liquid chromatography method for the analysis of complex polyphenol mixtures and application for sainfoin extracts (*Onobrychis viciifolia*). *J Chromatogr A.* 2010;1217:6169-6177.
 42. Fang F, Li JM, Pan QH, Huang WD. Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. *Food Chem.* 2006;10:428-433.
 43. Zuo Y, Chen H, Deng Y. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta.* 2002;5:307-316.
 44. Kolouchová-Hanzlíková I, Melzoch K, Filip V, Šmidrkal J. Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detections in wines. *Food Chem.*



- 2004;87:151-158.
45. Flamini R. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols. *Mass Spectrom Rev.* 2003;22:218-250.
 46. Dias F de S, Lovillo MP, Barroso CG, David JM. Optimization and validation of a method for the direct determination of catechin and epicatechin in red wines by HPLC/fluorescence. *Microchem J.* 2010;96:17-20.
 47. Viñas P, López-Erroz C, Marín-Hernández JJ, Hernández-Córdoba M. Determination of phenols in wines by liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection. *J Chromatogr A.* 2000;871:85-93.
 48. Vitrac X, Monti JP, Vercauteren J, Deffieux G, Meérillon JM. Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection. *Anal Chim Acta.* 2002;458:103-110.
 49. Spáčil Z, Nováková L, Solich P. Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography. *Talanta.* 2008;76:189-199.
 50. Wang SP, Huang KJ. Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J Chromatogr A.* 2004;1032:273-279.
 51. Fontana AR, Antonioli A, Bottini R. Development of a high-performance liquid chromatography method based on a core-shell column approach for the rapid determination of multiclass polyphenols in grape pomaces. *Food Chem.* 2016;192:1-8.
 52. Schwarz M, Rodríguez MC, Guillén DA, Barroso CG. Development and validation of UPLC for the determination of phenolic compounds and furanic derivatives in Brandy de Jerez. *J Sep Sci.* 2009;32:1782-1790.
 53. Antonioli A, Fontana AR, Piccoli P, Bottini R. Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. *Food Chem.* 2015;178:172-178.
 54. Ich. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. *Int Conf Harmon.* 2005;1994:17.
 55. Long GL, Winefordner JD. Limit of Detection: A Closer Look at the IUPAC Definition. *Anal Chem.* 1983;55:712A-724A.
 56. Piñeiro Z, Marrufo-Curtido A, Vela C, Palma M. Microwave-assisted extraction of stilbenes from woody vine material. *Food Bioprod Process.* 2017;103:18-26.
 57. Rajauria G. Optimization and validation of reverse phase HPLC method for qualitative and quantitative assessment of polyphenols in seaweed. *J Pharm Biomed Anal.* 2018;148:230-237.

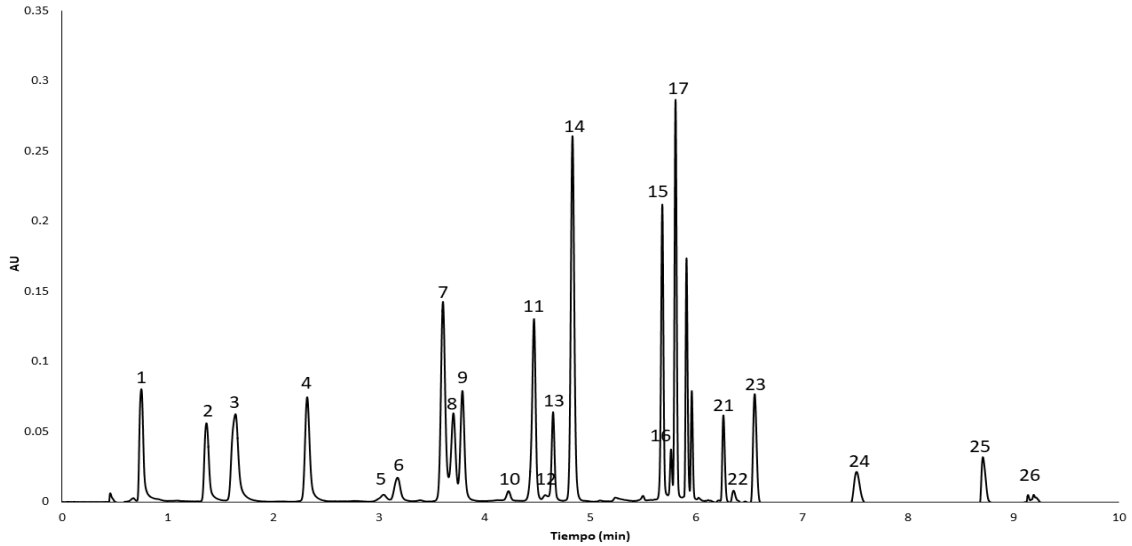


58. da Silva LP, Madureira F, de Azevedo Vargas E, Faria AF, Augusti R. Development and validation of a multianalyte method for quantification of mycotoxins and pesticides in rice using a simple dilute and shoot procedure and UHPLC-MS/MS. *Food Chem.* 2019;270:420-427.
59. Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis - Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Con. *J Chromatogr A.* 2003;987:57-66.
60. Osorio-Tobón JF, Carvalho PIN, Barbero GF, Nogueira GC, Rostagno MA, Meireles MADA. Fast analysis of curcuminoids from turmeric (*Curcuma longa* L.) by high-performance liquid chromatography using a fused-core column. *Food Chem.* 2016;200:167-174.
61. Stipcovich T, Barbero GF, Ferreiro-González M, Palma M, Barroso CG. Fast analysis of capsaicinoids in Naga Jolokia extracts (*Capsicum chinense*) by high-performance liquid chromatography using fused core columns. *Food Chem.* 2018;239:217-224.
62. Sganzerla M, Coutinho JP, de Melo AMT, Godoy HT. Fast method for capsaicinoids analysis from *Capsicum chinense* fruits. *Food Res Int.* 2014;64:718-725.
63. Guillarme D, Ruta J, Rudaz S, Veuthey JL. New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: A critical comparison of existing approaches. *Anal Bioanal Chem.* 2010;397:1069-1082.
64. Zheng J, Polyakova Y, Row KH. Retention factors and resolutions of amino benzoic acid isomers with some ionic liquids. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2006;11:477-483.
65. Snyder LR, Dolan JW. High-Performance Gradient Elution. *Journal of Chemical Information and Modeling.* 2016;53:1689-1699.

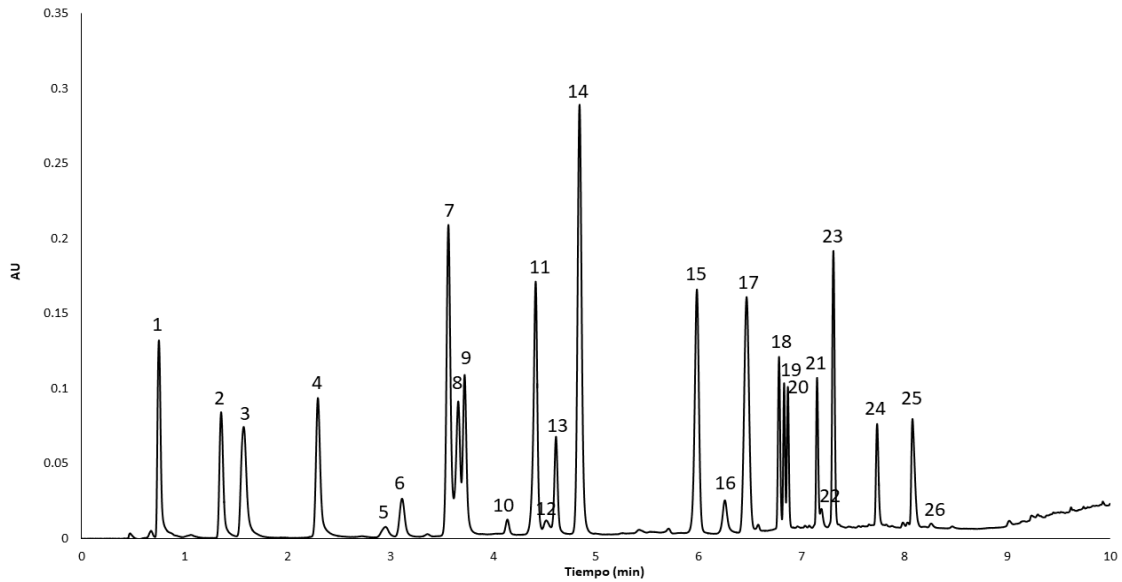


8. Anexo

Anexo 1. Cromatogramas obtenido con las pruebas de gradiente ($\lambda = 280 \text{ nm}$).



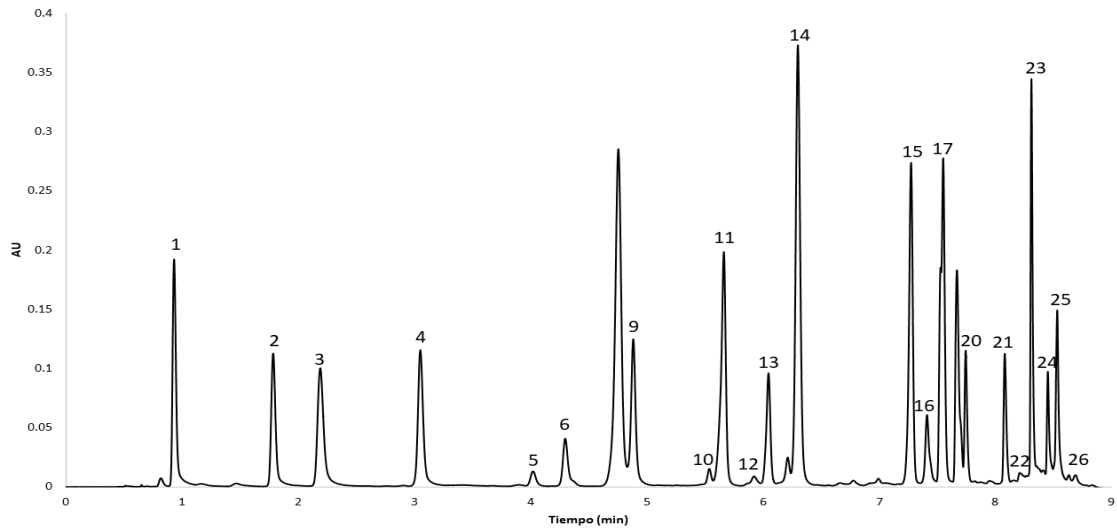
Anexo 1a. Cromatograma gradiente inicial.



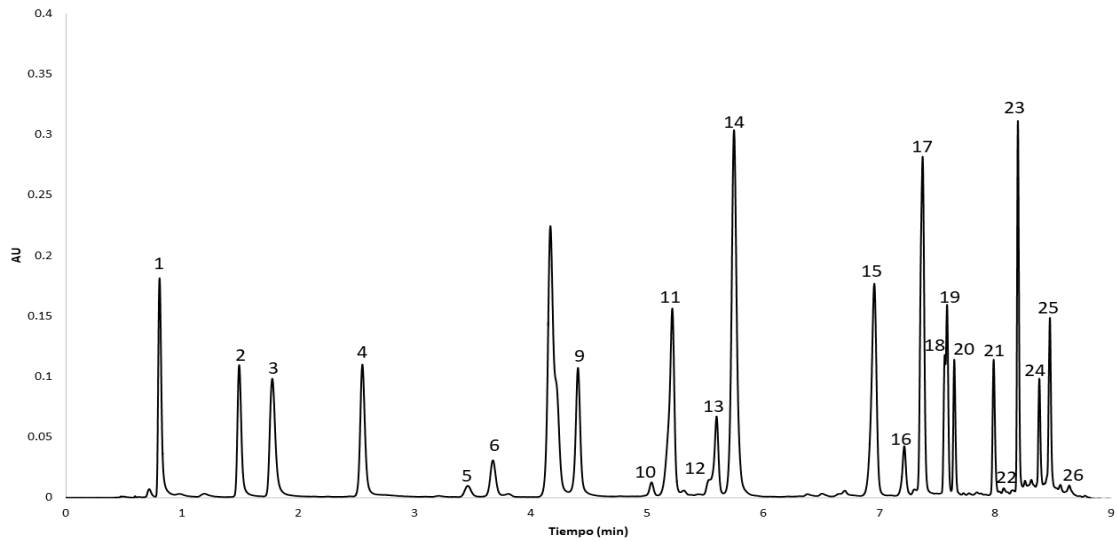
Anexo 1b. Cromatograma gradiente final.



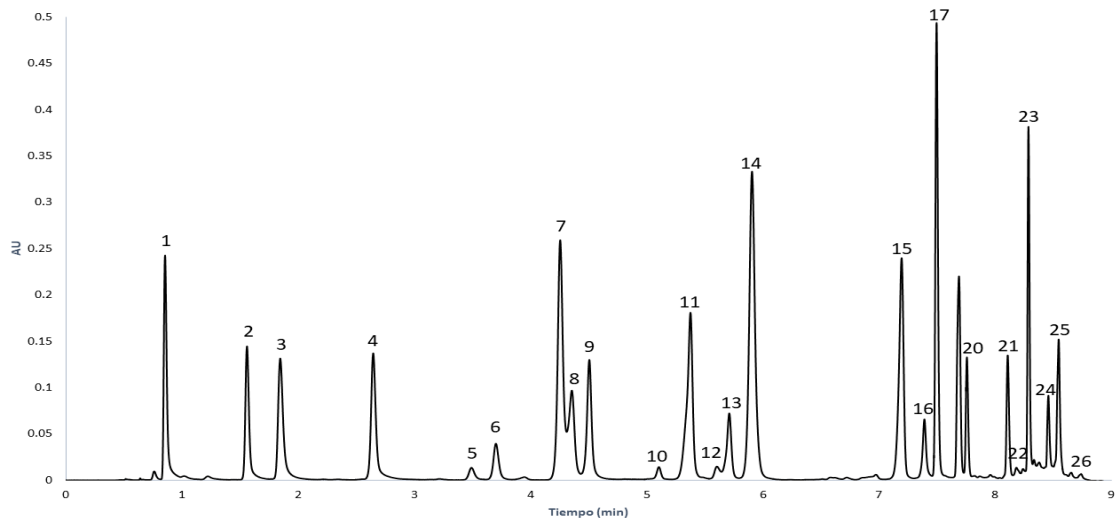
Anexo 2. Cromatogramas obtenido con las pruebas de temperatura ($\lambda = 280 \text{ nm}$).



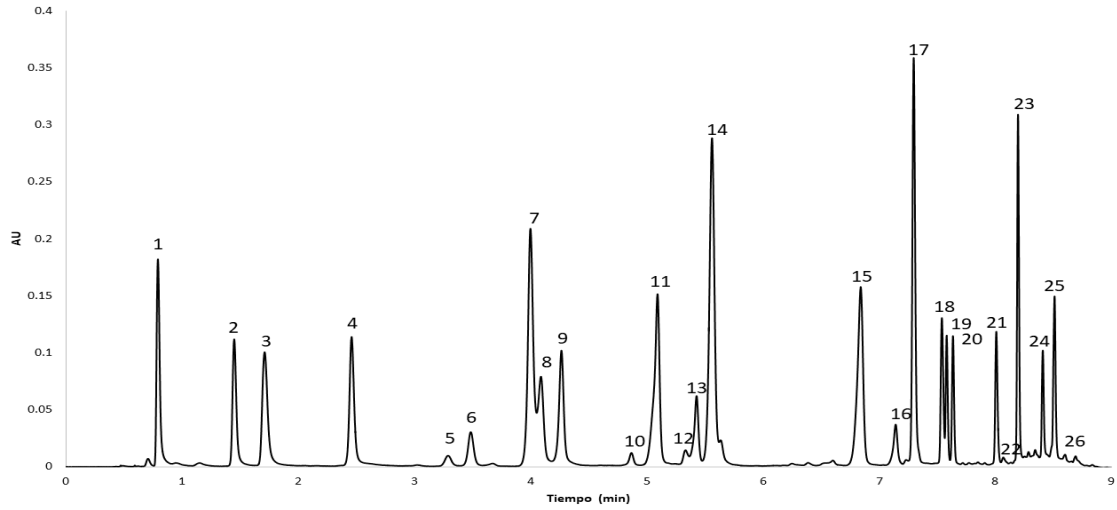
Anexo 2a. Cromatograma obtenido a 47 °C.



Anexo 2b. Cromatograma obtenido a 50 °C.

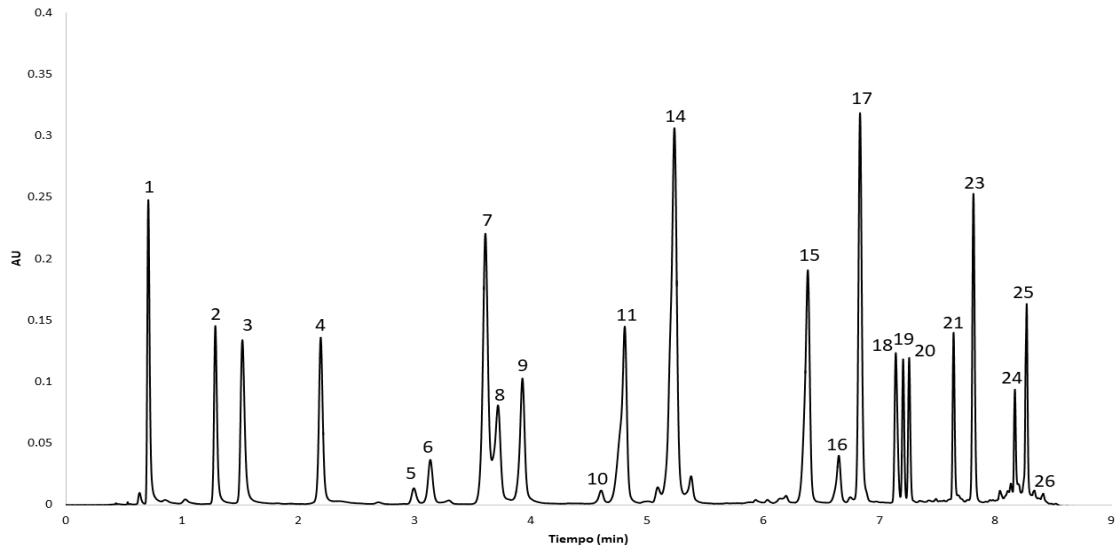


Anexo 2c. Cromatograma obtenido a 53 °C.

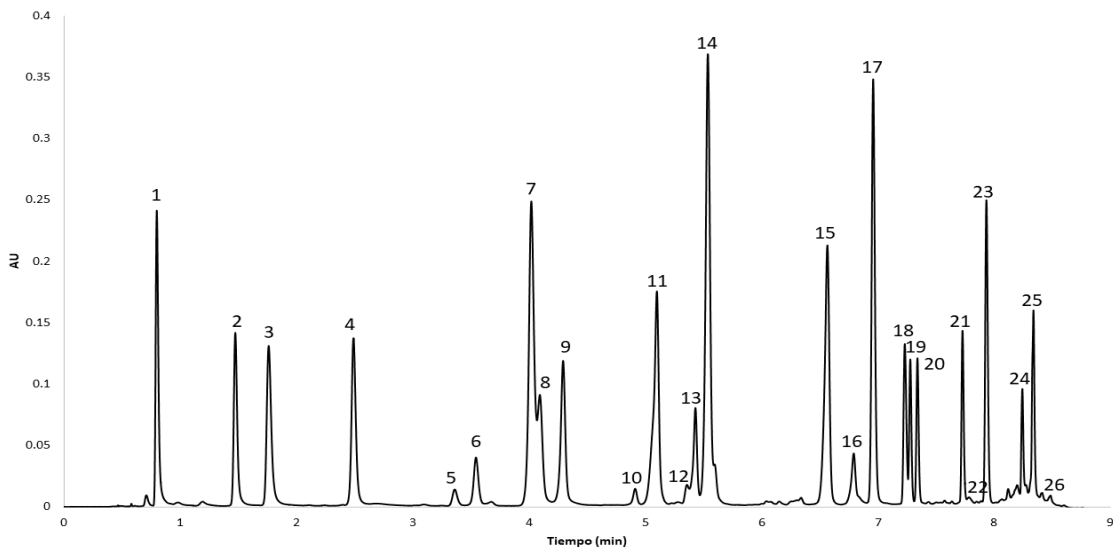


Anexo 2d. Cromatograma obtenido a 56 °C.

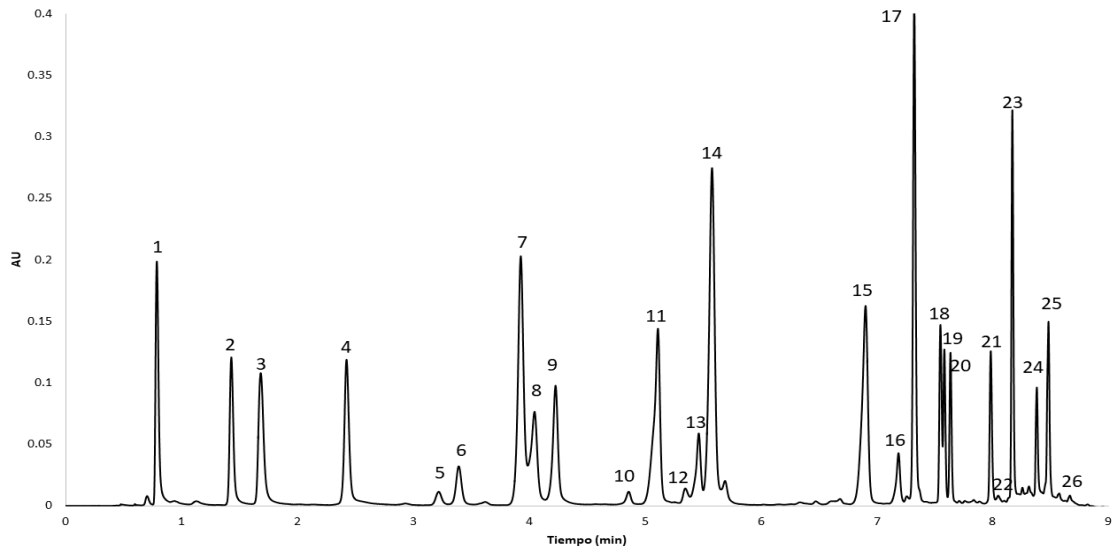
Anexo 3. Cromatogramas obtenido con las pruebas de flujo ($\lambda = 280 \text{ nm}$).



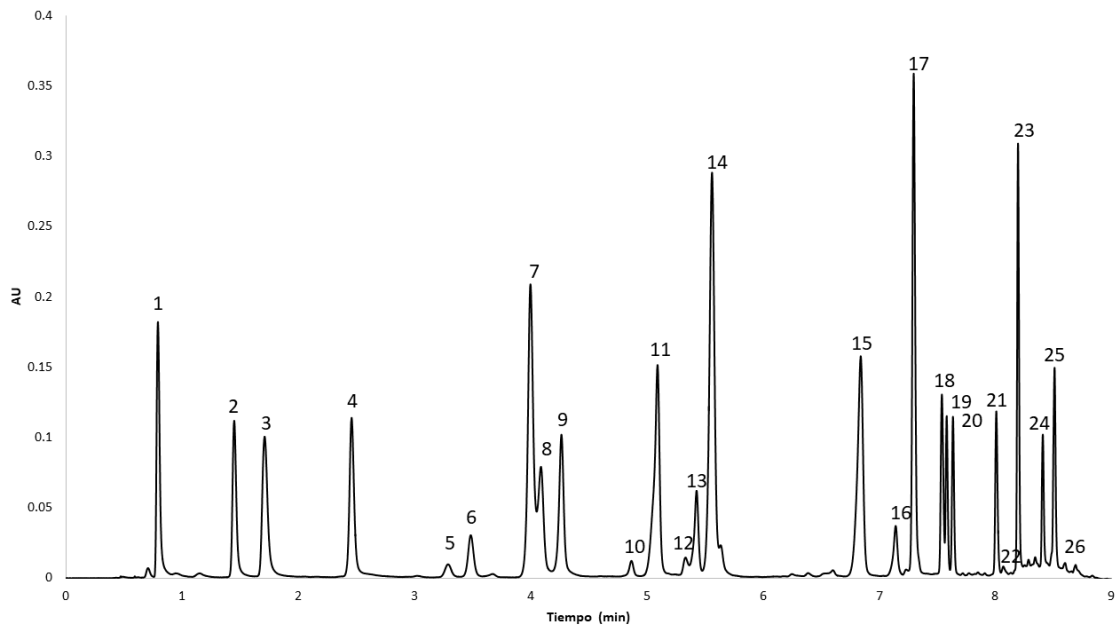
Anexo 3a. Cromatograma obtenido a 0,75 mL/min.



Anexo 3b. Cromatograma obtenido a 0,7 mL/min.



Anexo 3c. Cromatograma obtenido a 0,65 mL/min.



Anexo 3d. Cromatograma obtenido a 0,6 mL/min.



Anexo 4. *Curvas de calibrado, coeficiente de determinación y límites de detección y cuantificación de cada uno de los 27 compuestos fenólicos.*

Detector DAD				
Compuestos	Curva de calibración	R ²	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
Ácido gálico	$Y = 30593x + 1463,3$	0,9999	0,01457	0,04856
Ácido protocatequico	$y = 34822x + 9115,2$	0,9992	0,04250	0,1417
Ácido caftárico	$y = 16784x + 9115,2$	0,9992	0,02729	0,09096
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	$y = 92655x + 30156$	0,9995	0,01713	0,05711
Procianidina B ₁	$y = 3081,7x - 11267$	0,9995	0,2810	0,9367
Catequina	$y = 7954,5x + 3702,5$	0,9994	0,2294	0,7647
Ácido cafeico	$y = 43997x + 15355$	0,9999	0,01929	0,06429
Ácido vainillico	$y = 19017x + 9602,1$	0,9991	0,05688	0,1896
Ácido clorogénico	$y = 26134x + 11415$	0,9995	0,08929	0,2976
Procianidina B ₂	$y = 2684,9x + 4016,4$	0,9999	0,1707	0,5689
Ácido siríngico	$y = 36075x + 16719$	0,9992	0,0832	0,2772
EGCG	$y = 1986,2x - 674,56$	0,9990	0,5304	1,7681
Epicatequina	$y = 8084x + 5275.9$	0,9993	0,1545	0,5150
Ácido <i>p</i> -cumárico	$y = 123268x + 38069$	0,9994	0,0612	0,2042
Ácido ferúlico	$y = 66739x + 25722$	0,9990	0,1271	0,4238
ECG	$y = 25490x + 6757.3$	0,9997	0,0680	0,2265
<i>t</i> -Piceido	$y = 65789x + 15752$	0,9997	0,0456	0,1520
Quercetin 3- <i>O</i> -galactósido	$y = 27155x + 6685,1$	0,9999	0,04465	0,1488
Rutina	$y = 31359x + 7762.2$	0,9996	0,0957	0,3189
Quercetin 3- <i>O</i> -glucósido	$y = 25286x + 6589.1$	0,9994	0,05437	0,1812



Quercetin 3-O-rhamnósido	$y = 32785x + 8935.9$	0,9994	0,0528	0,1761
Kaempferol	$y = 14399x - 403945$	0,9996	0,08334	0,2778
<i>t</i> -Resveratrol	$y = 124798x + 30645$	0,9998	0,0116	0,0313
Quercetina	$y = 63420x - 20544$	0,9990	0,02442	0,08142
ϵ -Viniferina	$y = 53812x + 15145$	0,9999	0,07500	0,2500
Miricetina	$y = 38642x + 23552$	0,9991	0,01186	0,03953

Detector Fluorescencia				
Compuestos	Curva de calibración	R ²	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
Procianidina B ₁	$y = 3242x - 13516$	0,9991	0,187	0,879
ECG	$y = 25490x + 6757,3$	0,9997	0,0521	0,116
Procianidina A ₂	$y = 7016,1x + 4038,3$	0,9990	0,193	0,979
Catequina	$y = 407267x + 235473$	0,9990	0,17293	0,27643
Epicatequina	$y = 655670x + 365934$	0,9991	0,02847	0,1527
<i>t</i> -Piceido	$y = 30000000x - 10000000$	0,9995	0,0151	0,0505
<i>t</i> -Resveratrol	$y = 10000000x - 20000000$	0,9990	0,0102	0,0210
ϵ -Viniferina	$y = 10000000x - 10000000$	0,9992	0,01468	0,04894


Anexo 5. Repetibilidad ($n = 9$) y precisión intermedia ($n = 21$) del método analítico.

Detector DAD										
Compuesto	TR (min)		Anchura de pico (sec)		Altura de pico (μV)		Área de pico ($\mu\text{V sec}$)		Resolución de pico	
	Repe.	Precisión intermedia	Repe.	Precisión intermedia	Repe.	Precisión intermedia	Repe.	Precisión intermedia	Repe.	Precisión intermedia
Ácido gálico	0,11	0,56	0,85	3,31	0,38	4,26	0,19	2,33	-	-
Ácido protocatequico	0,11	0,84	1,15	2,77	0,23	3,11	0,29	1,87	0,53	1,37
Ácido caftárico	0,15	1,09	1,09	4,18	0,24	3,16	0,32	1,72	0,77	4,43
Ácido p -OH-benzoico	0,11	0,89	1,04	4,85	0,24	1,40	0,21	1,93	0,83	1,52
Procianidina B ₁	0,12	1,61	1,42	3,45	1,19	4,59	1,11	1,62	1,34	2,15
Catequina	0,14	1,32	1,71	3,78	0,90	3,00	0,31	0,87	1,71	4,91
Ácido cafeico	0,11	1,02	1,43	3,07	0,88	2,07	0,75	2,92	1,49	2,27
Ácido vainílico	0,11	0,99	1,38	3,87	0,87	2,77	1,64	3,56	1,31	4,03
Ácido clorogénico	0,18	1,15	1,04	2,48	1,32	3,25	0,18	1,87	2,18	4,86
Procianidina B ₂	0,34	1,04	0,90	1,49	1,95	3,17	0,54	2,11	2,30	3,36
Ácido siríngico	0,31	0,90	1,13	3,02	1,49	2,46	0,32	1,45	1,01	2,17
EGCG	0,32	0,90	3,65	3,14	4,09	3,93	1,73	4,86	4,66	4,90
Epicatequina	0,35	0,89	2,84	4,52	3,59	4,04	3,48	4,64	1,89	3,56
Ácido p -cumárico	0,26	0,76	1,68	3,95	1,10	1,62	1,73	2,21	3,96	4,61
Ácido ferúlico	0,39	0,55	1,57	4,92	1,41	2,51	0,30	1,92	2,07	3,35
ECG	0,28	0,40	0,94	2,24	4,26	4,66	1,51	2,33	3,44	4,62
t -Piceido	0,18	0,30	1,59	4,07	2,85	4,81	0,34	2,96	3,20	4,43
Quercetina 3- O -galactósido	0,22	0,31	0,99	2,02	2,78	4,50	0,41	2,70	3,06	4,73
Rutina	0,26	0,34	2,09	2,91	2,05	3,82	0,80	3,92	3,52	4,21
Quercetina 3- O -glucósido	0,27	0,34	1,69	1,82	2,01	3,50	0,84	2,94	1,74	4,16
Quercetina 3- O -rhamnósido	0,36	0,45	2,55	3,66	1,63	2,74	0,44	2,96	4,42	4,56
Kaempferol	0,33	0,42	1,48	2,43	1,92	4,97	3,64	4,50	3,66	4,99
t -Resveratrol	0,25	0,33	0,88	2,03	2,68	4,48	0,37	1,91	3,72	4,86
Quercetina	0,22	0,30	1,61	3,19	0,86	2,52	0,52	1,04	3,20	4,12
ϵ -Viniferina	0,24	0,33	1,38	2,52	0,79	1,87	0,39	1,59	3,07	3,88
Miricetina	0,27	0,34	2,32	2,86	1,12	2,13	3,20	3,10	4,40	4,81

Anexo 5. Repetibilidad ($n = 9$) y precisión intermedia ($n = 21$) del método analítico.

Detector DAD										
Compuesto	TR (min)		Anchura de pico (sec)		Altura de pico (μV)		Área de pico ($\mu\text{V sec}$)		Resolución de pico	
	Repe.	Precisión intermedia	Repe.	Precisión intermedia	Repe.	Precisión intermedia	Repe.	Precisión intermedia	Repe.	Precisión intermedia
Ácido gálico	0,11	0,56	0,85	3,31	0,38	4,26	0,19	2,33	-	-
Ácido protocatequico	0,11	0,84	1,15	2,77	0,23	3,11	0,29	1,87	0,53	1,37
Ácido caftárico	0,15	1,09	1,09	4,18	0,24	3,16	0,32	1,72	0,77	4,43
Ácido <i>p</i> -OH-benzoico	0,11	0,89	1,04	4,85	0,24	1,40	0,21	1,93	0,83	1,52
Procianidina B ₁	0,12	1,61	1,42	3,45	1,19	4,59	1,11	1,62	1,34	2,15
Catequina	0,14	1,32	1,71	3,78	0,90	3,00	0,31	0,87	1,71	4,91
Ácido cafeico	0,11	1,02	1,43	3,07	0,88	2,07	0,75	2,92	1,49	2,27
Ácido vainílico	0,11	0,99	1,38	3,87	0,87	2,77	1,64	3,56	1,31	4,03
Ácido clorogénico	0,18	1,15	1,04	2,48	1,32	3,25	0,18	1,87	2,18	4,86
Procianidina B ₂	0,34	1,04	0,90	1,49	1,95	3,17	0,54	2,11	2,30	3,36
Ácido siríngico	0,31	0,90	1,13	3,02	1,49	2,46	0,32	1,45	1,01	2,17
EGCG	0,32	0,90	3,65	3,14	4,09	3,93	1,73	4,86	4,66	4,90
Epicatequina	0,35	0,89	2,84	4,52	3,59	4,04	3,48	4,64	1,89	3,56
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,26	0,76	1,68	3,95	1,10	1,62	1,73	2,21	3,96	4,61

Ácido ferúlico	0,39	0,55	1,57	4,92	1,41	2,51	0,30	1,92	2,07	3,35
ECG	0,28	0,40	0,94	2,24	4,26	4,66	1,51	2,33	3,44	4,62
<i>t</i> -Piceido	0,18	0,30	1,59	4,07	2,85	4,81	0,34	2,96	3,20	4,43
Quercetina 3- <i>O</i> -galactósido	0,22	0,31	0,99	2,02	2,78	4,50	0,41	2,70	3,06	4,73
Rutina	0,26	0,34	2,09	2,91	2,05	3,82	0,80	3,92	3,52	4,21
Quercetina 3- <i>O</i> -glucósido	0,27	0,34	1,69	1,82	2,01	3,50	0,84	2,94	1,74	4,16
Quercetina 3- <i>O</i> -rhamnósido	0,36	0,45	2,55	3,66	1,63	2,74	0,44	2,96	4,42	4,56
Kaempferol	0,33	0,42	1,48	2,43	1,92	4,97	3,64	4,50	3,66	4,99
<i>t</i> -Resveratrol	0,25	0,33	0,88	2,03	2,68	4,48	0,37	1,91	3,72	4,86
Quercetina	0,22	0,30	1,61	3,19	0,86	2,52	0,52	1,04	3,20	4,12
ϵ -Viniferina	0,24	0,33	1,38	2,52	0,79	1,87	0,39	1,59	3,07	3,88
Miricetina	0,27	0,34	2,32	2,86	1,12	2,13	3,20	3,10	4,40	4,81

Detector FLR										
Compuesto	TR (min)		Anchura de pico (sec)		Altura de pico (μ V)		Área de pico (μ V sec)		Resolución de pico	
	Repe.	Precisión intermedia	Repe.	Precisión intermedia	Repe.	Precisión intermedia	Repe.	Precisión intermedia	Repe.	Precisión intermedia
Procianidina B ₁	0,37	1,53	1,94	3,70	2,09	3,89	4,07	4,19	-	-
ECG	0,24	0,48	1,02	1,20	2,67	4,30	1,77	3,93	2,16	2,30

Procianidina A ₂	0,18	0,33	3,97	4,64	2,41	3,74	3,19	4,51	4,32	4,62
Catequina	0,17	1,34	1,79	2,50	1,63	3,57	1,22	3,21	-	-
Epicatequina	0,32	0,89	0,75	1,47	0,36	0,37	0,02	0,22	1,60	2,76
<i>t</i> -Piceido	0,24	0,39	0,39	0,93	0,05	0,06	0,01	0,04	1,05	2,44
<i>t</i> -Resveratrol	0,23	0,35	0,41	0,92	0,06	0,06	0,02	0,05	1,55	2,31
ϵ -Viniferina	0,29	0,44	0,09	0,09	0,07	0,07	0,07	0,97	2,46	4,26

Anexo 6. Robustez del método para DAD y FLR.

DAD									
Temperatura de la columna (°C)									
Compuestos	Tiempo de retención (min)			Área ($\mu\text{v} \cdot \text{sec}$)			Resolución		
	51	54	57	51	54	57	51	54	57
Ácido gálico	0,874 ^a	0,859 ^b	0,811 ^c	391226 ^a	442218 ^b	348843 ^c	-	-	-
Ácido protocatéquico	1,634 ^a	1,567 ^b	1,483 ^c	733559 ^a	824681 ^b	661131 ^c	3,79 ^a	3,57 ^b	3,57 ^b
Ácido caftárico	1,964 ^a	1,858 ^b	1,747 ^c	753115 ^a	839101 ^b	681728 ^c	0,85 ^a	0,73 ^b	0,60 ^c
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	2,784 ^a	2,660 ^b	2,510 ^c	1694022 ^a	1889974 ^b	1518788 ^c	1,39 ^a	1,36 ^a	1,32 ^a
Procianidina B ₁	3,679 ^a	3,506 ^b	3,307 ^c	39198 ^a	44782 ^b	37485 ^c	2,12 ^a	2,01 ^{a,b}	1,55 ^b
Catequina	3,915 ^a	3,719 ^b	3,480 ^c	108372 ^a	127908 ^b	102586 ^c	1,15 ^a	1,04 ^b	1,90 ^c
Ácido cafeico	-	4,004 ^a	3,832 ^b	-	843951 ^a	648477 ^b	-	1,52 ^a	1,94 ^b
Ácido vainílico	-	4,374 ^a	4,082 ^b	-	359438 ^a	286693 ^b	-	0,57 ^b	0,88 ^b

Ácido clorogénico	4,611 ^a	4,520 ^b	4,324 ^c	569585 ^a	655284 ^b	528073 ^c	-	1,90 ^a	1,54 ^b
Procianidina B ₂	5,258 ^a	5,124 ^b	5,192 ^c	29191 ^a	32456 ^b	31549 ^c	2,75 ^a	2,59 ^a	2,15 ^c
Ácido siríngico	5,451 ^a	5,402 ^b	5,040 ^c	551866 ^a	631460 ^b	510466 ^c	1,01 ^a	1,45 ^b	1,57 ^b
EGCG	5,799 ^a	5,632 ^b	5,273 ^c	35584 ^a	38638 ^b	23691 ^c	2,05 ^a	1,35 ^b	1,09 ^c
Epicatequina	5,839 ^a	5,739 ^b	5,555 ^c	175137 ^a	198759 ^b	115702 ^c	0,42 ^a	1,02 ^b	1,21 ^c
Ácido <i>p</i> -cumárico	6,043 ^a	5,941 ^b	5,729 ^c	1547113 ^a	1735013 ^b	1351388 ^c	1,22 ^a	1,36 ^a	1,16 ^a
Ácido ferúlico	6,821 ^a	7,250 ^b	7,040 ^c	962555 ^a	1180692 ^b	962555 ^a	2,96 ^a	5,12 ^b	4,96 ^c
ECG	7,406 ^a	7,444 ^a	7,156 ^b	103867 ^a	133384 ^b	88696 ^c	2,29 ^a	0,88 ^b	0,52 ^c
<i>t</i> -Piceido	7,517 ^a	7,548 ^a	7,287 ^b	598630 ^a	673393 ^b	520751 ^c	0,71 ^a	0,72 ^a	1,16 ^a
Quercetina 3- <i>O</i> -galactósido	-	-	7,622 ^a	-	-	341865 ^a	-	-	0,96 ^a
Rutina	-	-	7,643 ^a	-	-	313112 ^c	-	-	0,36 ^a
Quercetina 3- <i>O</i> -glucósido	7,752 ^a	7,806 ^b	7,702 ^c	355182 ^a	398026 ^b	316830 ^c	-	-	0,98 ^a
Quercetina 3- <i>O</i> -rhamnósido	8,083 ^a	8,146 ^b	8,025 ^c	366828 ^a	408891 ^b	319135 ^c	4,19 ^a	4,18 ^a	3,97 ^a
Kaempferol	8,183 ^a	8,219 ^a	8,140 ^b	20648 ^a	17744 ^b	21357 ^a	1,14 ^a	0,90 ^a	1,64 ^b
<i>t</i> -Resveratrol	8,283 ^a	8,311 ^a	8,201 ^b	737465 ^a	816034 ^b	664035 ^c	1,34 ^a	1,23 ^{a,b}	0,68 ^b
Quercetina	8,452 ^a	8,482 ^a	8,454 ^a	358381 ^a	345582 ^b	343482 ^b	1,98 ^a	1,74 ^a	2,76 ^b
ε-Viniferina	8,544 ^a	8,578 ^a	8,538 ^a	447553 ^a	480506 ^b	409461 ^c	0,74 ^a	1,05 ^a	0,71 ^a
Miricetina	8,647 ^a	8,658 ^a	8,628 ^a	17760 ^a	18245 ^a	17588 ^a	1,08 ^a	0,90 ^a	1,03 ^a

DAD									
Flujo (mL/min)									
Compuestos	Tiempo de retención (min)			Área ($\mu\text{v} \cdot \text{sec}$)			Resolución		
	0,57	0,6	0,63	0,57	0,6	0,63	0,57	0,6	0,63
Ácido gálico	0,858 ^a	0,811 ^b	0,783 ^c	402587 ^a	348843 ^b	365492 ^c	-	-	-
Ácido protocatéquico	1,558 ^a	1,483 ^b	1,425 ^c	761256 ^a	661131 ^b	686415 ^c	3,50 ^a	3,51 ^a	3,20 ^b
Ácido caftárico	1,832 ^a	1,747 ^b	1,679 ^c	777835 ^a	681728 ^b	703566 ^c	0,71 ^a	0,65 ^b	0,66 ^b
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	2,628 ^a	2,510 ^b	2,419 ^c	1762305 ^a	1518788 ^b	1580191 ^c	1,35 ^a	1,32 ^a	1,26 ^b
Procianidina B ₁	3,368 ^a	3,307 ^a	3,208 ^c	4275 ^a	37485 ^b	36528 ^c	1,75 ^a	1,55 ^b	1,87 ^c
Catequina	3,574 ^a	3,480 ^b	3,381 ^c	118200 ^a	102586 ^b	104274 ^c	1,01 ^a	1,85 ^b	0,84 ^c
Ácido cafeico	4,156 ^a	4,00 ^b	3,912 ^c	759629 ^a	648477 ^b	692558 ^c	3,06 ^a	2,90 ^b	2,82 ^b
Ácido vainílico	4,282 ^a	4,082 ^b	4,029 ^c	343461 ^a	286693 ^b	305769 ^c	0,88 ^a	0,54 ^b	0,78 ^b
Ácido clorogénico	4,416 ^a	4,324 ^b	4,209 ^c	598151 ^a	528115 ^b	549352 ^c	0,59 ^a	1,03 ^b	0,74 ^c
Procianidina B ₂	5,052 ^a	5,192 ^b	4,845 ^c	29197 ^a	31549 ^b	27050 ^c	2,75 ^a	2,59 ^a	2,70 ^c
Ácido siríngico	5,371 ^a	5,040 ^b	5,095 ^b	591408 ^a	510466 ^b	523101 ^c	1,55 ^a	1,57 ^{a,b}	1,22 ^b
EGCG	5,578 ^a	5,273 ^b	5,338 ^c	26141 ^a	23691 ^b	21599 ^c	1,12 ^a	0,48 ^a	1,31 ^c
Epicatequina	5,707 ^a	5,555 ^b	5,456 ^c	151697 ^a	115702 ^b	112155 ^b	1,28 ^a	2,29 ^b	1,21 ^a
Ácido <i>p</i> -cumárico	5,893 ^a	5,729 ^b	5,568 ^c	1573808 ^a	1351388 ^b	1402991 ^b	1,27 ^a	1,16 ^{a,b}	0,77 ^b
Ácido ferúlico	7,240 ^a	7,040 ^b	6,889 ^c	1110554 ^a	962555 ^b	1000468 ^c	5,45 ^a	4,96 ^b	5,35 ^a

ECG	7,458 ^a	7,156 ^b	7,179 ^b	116445 ^a	88696 ^b	92583 ^c	0,97 ^a	0,51 ^b	1,30 ^c
<i>t</i> -Piceido	7,568 ^a	7,287 ^b	7,316 ^b	604553 ^a	520751 ^b	542469 ^c	1,00 ^a	1,03 ^a	1,19 ^c
Quercetina 3- <i>O</i> -galactósido	7,774 ^a	7,622 ^b	7,542 ^b	378055 ^a	341865 ^b	360535 ^c	2,62 ^a	3,73 ^b	3,13 ^c
Rutina	7,815 ^a	7,643 ^b	7,580 ^c	393839 ^a	313112 ^b	338564 ^c	0,42 ^a	0,42 ^{a,b}	0,60 ^b
Quercetina 3- <i>O</i> -glucósido	7,862 ^a	7,702 ^b	7,634 ^c	370949 ^a	316830 ^b	334207 ^c	1,08 ^a	0,99 ^a	0,99 ^a
Quercetina 3- <i>O</i> -rhamnósido	8,227 ^a	8,025 ^b	7,989 ^c	379962 ^a	319135 ^b	340561 ^c	4,62 ^a	4,52 ^a	4,46 ^a
Kaempferol	8,286 ^a	8,140 ^b	8,054 ^c	21811 ^a	21357 ^a	19063 ^b	0,66 ^a	0,93 ^a	0,70 ^a
<i>t</i> -Resveratrol	8,372 ^a	8,201 ^b	8,174 ^b	741120 ^a	664035 ^b	691009 ^a	1,18 ^a	0,68 ^a	1,47 ^c
Quercetina	8,558 ^a	8,454 ^b	8,383 ^c	371267 ^a	343482 ^b	337497 ^c	2,20 ^a	2,82 ^b	2,39 ^c
ϵ -Viniferina	8,660 ^a	8,538 ^b	8,481 ^b	462031 ^a	409461 ^{a,b}	420801 ^b	0,87 ^a	0,71 ^a	0,85 ^a
Miricetina	8,769 ^a	8,628 ^b	8,579 ^b	18622 ^a	17588 ^a	17975 ^a	1,21 ^a	1,08 ^a	1,09 ^a

DAD									
Volumen de Inyección (μ L)									
Compuestos	Tiempo de retención (min)			Área (μ v *sec)			Resolución		
	2,8	3	3,2	2,8	3	3,2	2,8	3	3,2
Ácido gálico	0,816 ^a	0,811 ^a	0,807 ^a	354584 ^a	348843 ^b	403404 ^c	-	-	-
Ácido protocatéquico	1,485 ^a	1,483 ^a	1,468 ^a	668800 ^a	661131 ^b	761979 ^c	3,37 ^a	3,51 ^b	3,36 ^a

Ácido caftárico	1,750 ^a	1,747 ^a	1,745 ^a	686772 ^a	681728 ^a	784541 ^b	0,69 ^a	0,65 ^b	0,69 ^{a,b}
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	2,516 ^a	2,510 ^a	2,513 ^a	1542137 ^a	1518788 ^b	1758518 ^c	1,38 ^a	1,26 ^a	1,29 ^a
Procianidina B ₁	3,296 ^a	3,307 ^a	3,310 ^a	37154 ^a	37485 ^a	41312 ^b	1,830 ^a	1,89 ^b	1,88 ^b
Catequina	3,485 ^a	3,480 ^a	3,499 ^a	103583 ^a	102586 ^a	116800 ^b	0,896 ^a	0,86 ^a	0,88 ^a
Ácido cafeico	4,037 ^a	4,00 ^b	4,049 ^c	662497 ^a	648477 ^a	767236 ^b	2,890 ^a	3,37 ^a	2,87 ^a
Ácido vainílico	4,156 ^a	4,082 ^b	4,166 ^a	277774 ^a	286693 ^a	335242 ^b	0,870 ^a	0,82 ^a	0,81 ^a
Ácido clorogénico	4,325 ^a	4,324 ^a	4,340 ^a	533614 ^a	528073 ^b	611277 ^c	0,72 ^a	1,09 ^b	0,74 ^a
Procianidina B ₂	4,994 ^a	5,192 ^a	5,000 ^a	25768 ^a	31549 ^b	30030 ^c	2,85 ^a	2,19 ^b	2,84 ^a
Ácido siríngico	5,266 ^a	5,040 ^a	5,263 ^a	508978 ^a	511088 ^a	581759 ^b	1,33 ^a	1,57 ^{a,b}	1,27 ^b
EGCG	5,506 ^a	5,273 ^b	5,502 ^a	22557 ^a	23691 ^{a,b}	24723 ^b	1,29 ^a	1,09 ^b	1,27 ^{a,b}
Epicatequina	5,626 ^a	5,555 ^a	5,616 ^a	130387 ^a	115702 ^b	148535 ^c	2,69 ^{a,b}	2,29 ^a	1,1 ^b
Ácido <i>p</i> -cumárico	5,746 ^a	5,729 ^a	5,745 ^a	1388137 ^a	1351388 ^b	1584607 ^c	0,83 ^a	1,16 ^a	0,84 ^a
Ácido ferúlico	7,065 ^a	7,040 ^a	7,052 ^a	972051 ^a	962555 ^b	1105667 ^c	5,19 ^a	4,96 ^a	5,17 ^b
ECG	7,308 ^a	7,156 ^b	7,297 ^a	90180 ^a	88696 ^b	100653 ^c	1,09 ^a	0,51 ^b	1,10 ^a
<i>t</i> -Piceido	7,428 ^a	7,287 ^b	7,419 ^a	527362 ^a	520751 ^b	594648 ^c	1,12 ^a	1,16 ^a	1,12 ^a
Quercetina 3- <i>O</i> -galactósido	7,638 ^a	7,622 ^a	7,628 ^a	336994 ^a	341865 ^b	385994 ^c	2,73 ^a	3,73 ^b	2,76 ^a
Rutina	7,667 ^a	7,643 ^b	7,659 ^a	344657 ^a	313051 ^b	388540 ^c	0,477 ^a	0,42 ^a	0,51 ^a
Quercetina 3- <i>O</i> -glucósido	7,725 ^a	7,702 ^b	7,718 ^a	326187 ^a	316830 ^b	371023 ^c	1,02 ^a	0,99 ^a	1,03 ^a
Quercetina 3- <i>O</i> -rhamnósido	8,087 ^a	8,025 ^b	8,082 ^a	331342 ^a	319135 ^b	374924 ^c	4,42 ^a	4,52 ^a	4,43 ^a

Kaempferol	8,158 ^a	8,140 ^a	8,133 ^a	19845 ^a	21357 ^a	21556 ^a	0,74 ^a	0,93 ^a	0,71 ^a
<i>t</i> -Resveratrol	8,265 ^a	8,201 ^b	8,256 ^a	673559 ^a	664035 ^b	764354 ^c	1,30 ^a	0,68 ^a	1,28 ^a
Quercetina	8,460 ^a	8,454 ^a	8,453 ^a	329837 ^a	343482 ^b	368477 ^c	2,11 ^a	2,77 ^b	2,14 ^a
ϵ -Viniferina	8,558 ^a	8,538 ^a	8,553 ^a	405457 ^a	409461 ^{a,b}	457675 ^b	0,80 ^a	0,71 ^a	0,82 ^a
Miricetina	8,656 ^a	8,628 ^b	8,651 ^a	16630 ^a	17588 ^{a,b}	19087 ^b	1,07 ^a	1,08 ^a	1,06 ^a

FLR									
Temperatura de la columna (°C)									
Compuestos	Tiempo de retención (min)			Área ($\mu\text{v} \cdot \text{sec}$)			Resolución		
	51	54	57	51	54	57	51	54	57
Procianidina B ₁	3,926 ^a	3,727 ^b	3,292 ^c	77374,250 ^a	61368,500 ^b	56635,750 ^c	-	-	-
ECG	7,526 ^a	7,554 ^a	7,319 ^b	515431,000 ^a	458151,750 ^b	385418,500 ^c	28,219 ^a	41,175 ^b	29,525 ^c
Procianidina A ₂	7,709 ^a	7,745 ^a	7,745 ^a	56921,250 ^a	30882,750 ^b	24880,750 ^b	4,500 ^a	2,631 ^a	5,834 ^b
Catequina	3,920 ^a	3,723 ^b	3,296 ^c	1079156 2,750 ^a	10294304,750 ^b	8413685,500 ^c	-	-	-
Epicatequina	5,841 ^a	5,733 ^b	5,354 ^c	204052922,000 ^a	203978290,750 ^a	102423062,750 _b	15,723 ^a	17,226 ^a	21,390 ^a
<i>t</i> -Pceido	7,525 ^a	7,554 ^a	7,271 ^b	200113872,750 ^a	200155463,5 ^a	179970279,750 ^a	33,670 ^a	36,420 ^b	42,152 ^c
<i>t</i> -Resveratrol	8,304 ^a	8,321 ^a	8,150 ^b	249749925,000 ^a	225026469,000 ^a	200022520,500 ^a	14,501 ^a	14,763 ^a	16,983 ^a
ϵ -Viniferina	8,550 ^a	8,592 ^a	8,450 ^b	325420459,250 ^a	350399901,000 ^a	232719701,500 ^a	3,807 ^a	4,143 ^a	5,139 ^b

FLR									
Flujo (mL/min)									
Compuestos	Tiempo de retención (min)			Área ($\mu\text{v} \cdot \text{sec}$)			Resolución		
	0,57	0,6	0,63	0,57	0,6	0,63	0,57	0,6	0,63
Procianidina B ₁	3,579 ^a	3,292 ^b	3,143 ^{a,b}	78007,750	56635,750	74066,000	-	-	-
ECG	7,569 ^a	7,319 ^b	7,319 ^b	477530,500 ^a	385418,500 ^b	398838,000 ^b	34,284 ^a	29,525 ^a	43,229 ^b
Procianidina A ₂	7,783 ^a	7,541 ^b	7,554 ^b	34403,500 ^a	31183,000 ^a	33759,500 ^a	2,593 ^a	3,443 ^b	4,044 ^c
Catequina	3,565 ^a	3,296 ^b	3,380 ^c	10171745,250 ^a	8413685,500 ^b	8883267,000 ^c	-	-	-
Epicatequina	5,700 ^a	5,354 ^b	5,450 ^c	178897495,500 ^a	102423062,75000,000 ^b	102780770,500 ^{a,b}	19,005 ^a	21,390 ^a	18,427 ^a
<i>t</i> -Piceido	7,57 ^a	7,271 ^b	7,317 ^c	225098885,750 ^a	179970279,75000,000 ^a	200057728,750 ^a	37,420 ^a	42,152 ^a	41,247 ^a
<i>t</i> -Resveratrol	8,375 ^a	8,150 ^b	8,175 ^b	200087791,000 ^a	200022520,50000,000 ^a	199973158,500 ^a	14,937 ^a	16,983 ^{a,b}	17,003 ^b
ϵ -Viniferina	8,658 ^a	8,450 ^b	8,488 ^b	350415786,000 ^a	232719701,50000,000 ^b	325200679,250 ^a	5,260 ^a	4,996 ^a	5,357 ^a

FLR									
Volumen de Inyección (μL)									
Compuestos	Tiempo de retención (min)			Área (μv *sec)			Resolución		
	2,8	3	3,2	2,8	3	3,2	2,8	3	3,2
Procianidina B ₁	3,496 ^a	3,292 ^b	3,471 ^a	48435,000 ^a	56635,750 ^b	69518,500 ^a	-	-	-
ECG	7,438 ^a	7,329 ^b	7,418 ^c	418277,500 ^a	385418,500 ^b	432566,000 ^{a,b}	34,118 ^a	29,525 ^a	29,471 ^a
Procianidina A ₂	7,657 ^a	7,541 ^b	7,646 ^a	32193,500 ^a	31183,000 ^a	28181,250 ^a	2,630 ^a	3,443 ^b	2,910 ^a
Catequina	3,490 ^a	3,296 ^b	3,466 ^a	9027597,750 ^a	8413685,500 ^a	9135800,500 ^a	-	-	-
Epicatequina	5,625 ^a	5,354 ^b	5,588 ^a	127846347,250 ^a	102423062,750 ^a	155902146,000 ^a	18,298 ^a	21,390 ^a	18,189 ^a
<i>t</i> -Piceido	7,646 ^{a,b}	7,271 ^a	7,421 ^b	199972211,000 ^a	179970279,750 ^a	224966187,500 ^a	40,410 ^{a,b}	42,152 ^a	36,745 ^b
<i>t</i> -Resveratrol	8,275 ^a	8,150 ^b	8,263 ^a	199940028,250 ^a	200022520,500 ^a	199982164,750 ^a	12,590 ^a	16,983 ^a	16,755 ^a
ε-Viniferina	8,55425 ^a	8,45000 ^b	8,55850 ^a	300398626,500 ^a	232719701,500 ^a	300303355,000 ^a	4,787 ^a	5,139 ^{a,b}	5,179 ^b

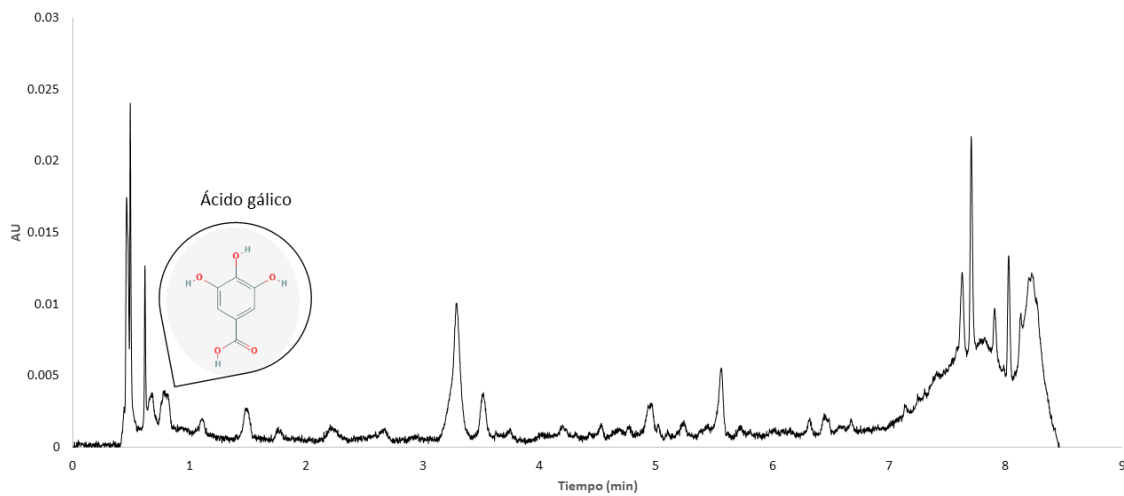

Anexo 7. Propiedades cromatográficas del método desarrollado.

Detector DAD					
Compuestos	Tiempo de retención (min)	Ancho (sec)	Factor de retención (K)	Selectividad (α)	Resolución (Rs)
Ácido gálico	0,81	8,53	0,68	-	-
Ácido protocatéquico	1,48	14,43	2,08	3,04	3,57
Ácido caftárico	1,75	34,19	2,62	1,26	0,60
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	2,51	35,12	4,21	1,60	1,32
Procianidina B ₁	3,31	10,99	5,86	1,39	1,55
Catequina	3,48	13,40	6,22	1,06	1,90
Ácido cafeico	3,83	8,29	6,95	1,12	1,94
Ácido vainílico	4,08	8,01	7,47	1,07	0,88
Ácido clorogénico	4,32	20,99	7,97	1,07	1,54
Procianidina B ₂	4,74	14,18	8,84	1,11	2,15 ^c
Ácido siríngico	5,19	20,15	9,77	1,11	1,57
EGCG	5,27	5,68	9,94	1,02	1,09
Epicatequina	5,56	6,72	10,52	1,06	1,21
Ácido <i>p</i> -cumárico	5,73	11,23	10,89	1,03	1,16
Ácido ferúlico	7,04	20,45	13,61	1,25	4,96
ECG	7,16	8,30	13,85	1,02	0,52
<i>t</i> -piceido	7,29	5,23	14,12	1,02	1,16
Quercetina 3- <i>O</i> -galactósido	7,62	3,64	14,81	1,05	0,96
Rutina	7,64	2,83	14,86	1,00	0,36
Quercetina 3- <i>O</i> -glucósido	7,70	4,43	14,98	1,01	0,98
Quercetina 3- <i>O</i> -rhamnósido	8,03	5,36	15,65	1,04	3,97
Kaempferol	8,14	5,55	15,89	1,02	1,64
<i>t</i> -Resveratrol	8,20	4,06	16,01	1,01	0,68
Quercetina	8,45	6,83	16,54	1,03	2,76
ϵ -Viniferina	8,54	7,38	16,71	1,01	0,70
Miricetina	8,63	3,18	16,90	1,01	1,03

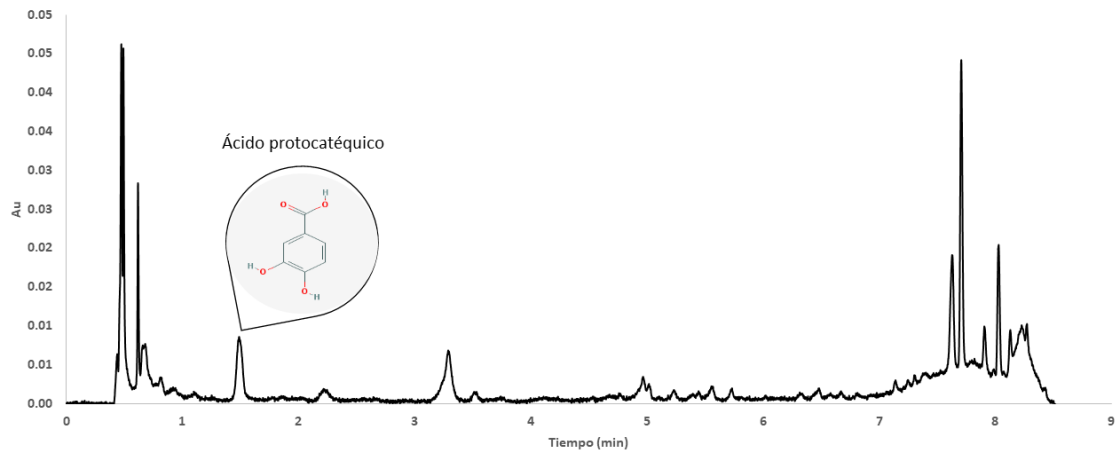


Detector FLR					
Compuestos	Tiempo de retención (min)	Ancho (sec)	Factor de retención (K)	Selectividad (α)	Resolución (Rs)
Procianidina B ₁	3,30	8	5,84	-	-
ECG	7,29	5	14,23	2,42	36,87
Procianidina A ₂	7,55	3	24,67	1,04	3,97
Catequina	3,30	11	5,84	-	-
Epicatequina	5,35	2	10,11	1,73	19,00
<i>t</i> -piceido	7,27	3	14,08	1,39	46,00
<i>t</i> -Resveratrol	8,15	3	15,91	1,13	17,59
ϵ -Viniferina	8,45	4	16,53	1,04	5,14

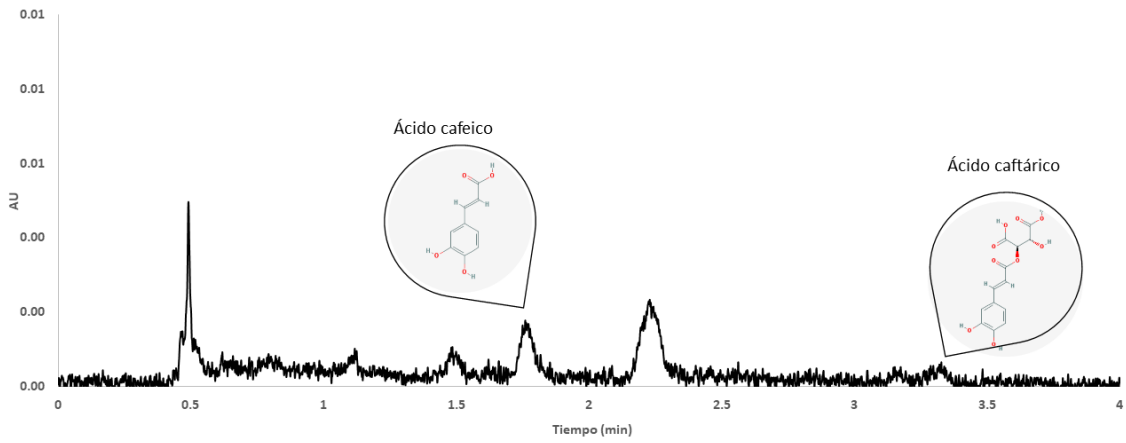
Anexo 8. Cromatograma obtenidos para las muestras de uva.



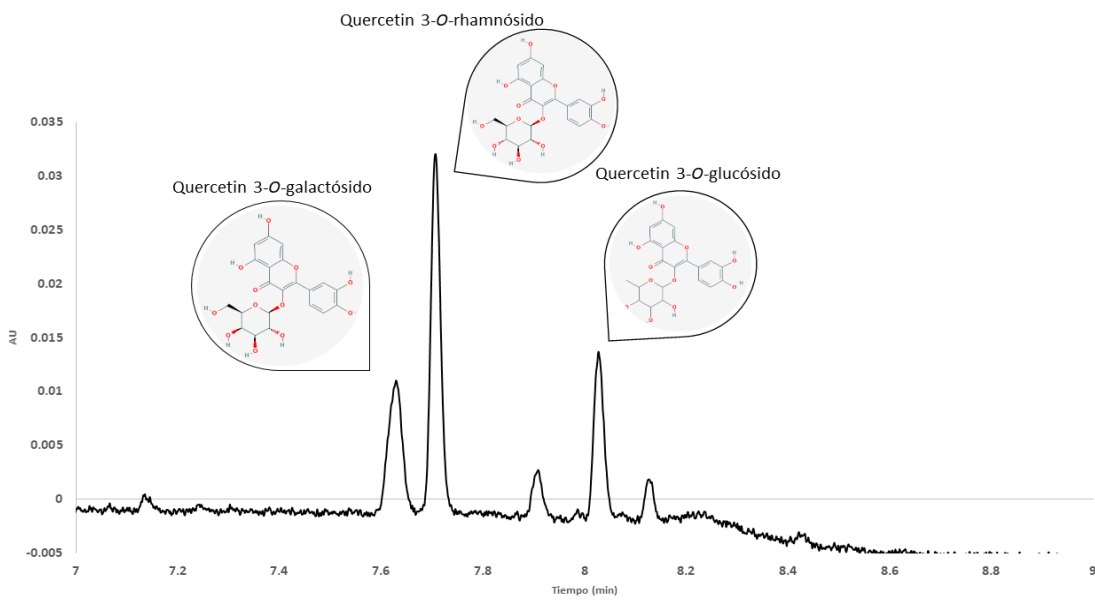
Anexo 8a. Cromatograma de uva a 280 nm mediante UHPLC-DAD.



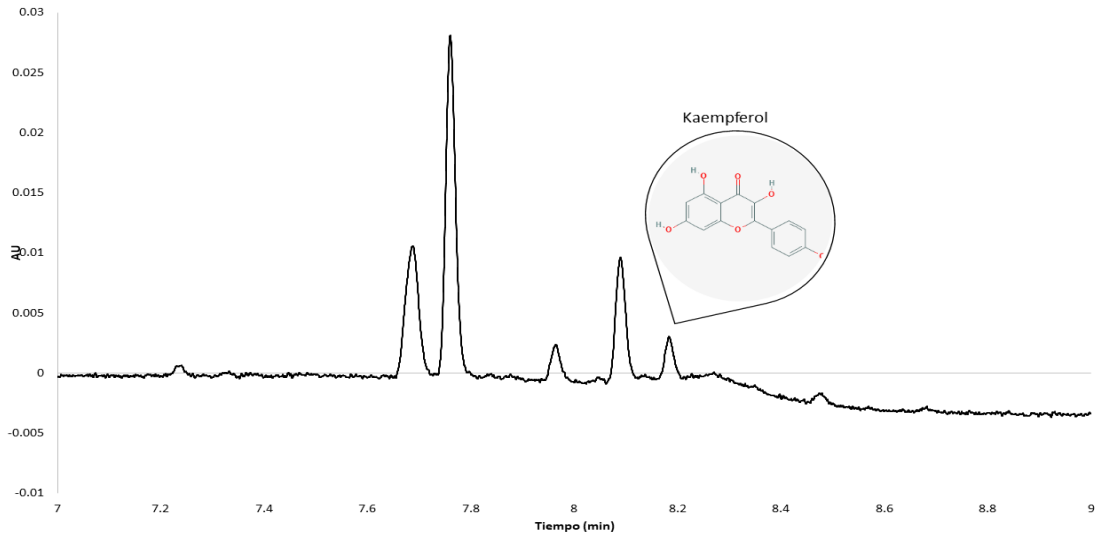
Anexo 8b. Cromatograma de uva a 259 nm mediante UHPLC-DAD.



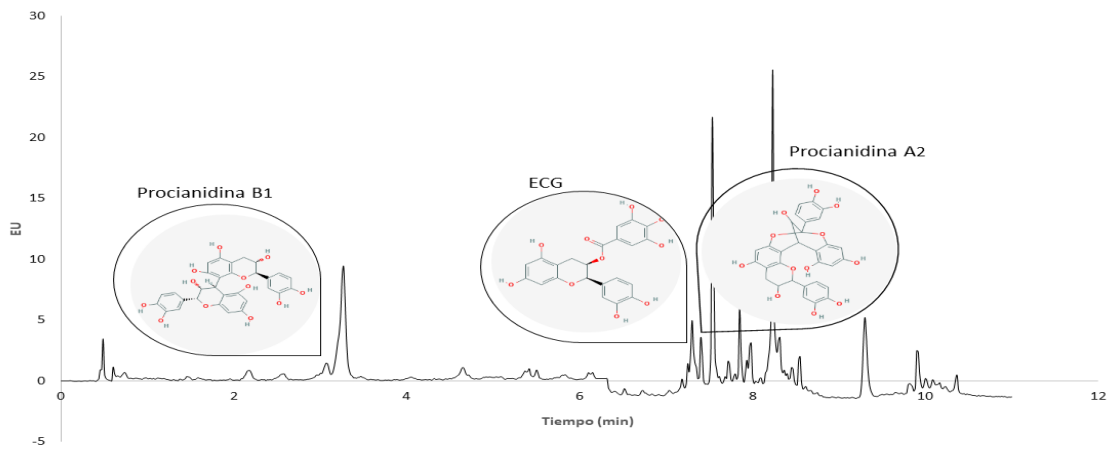
Anexo 8c. Cromatograma de uva a 320 nm mediante UHPLC-DAD.



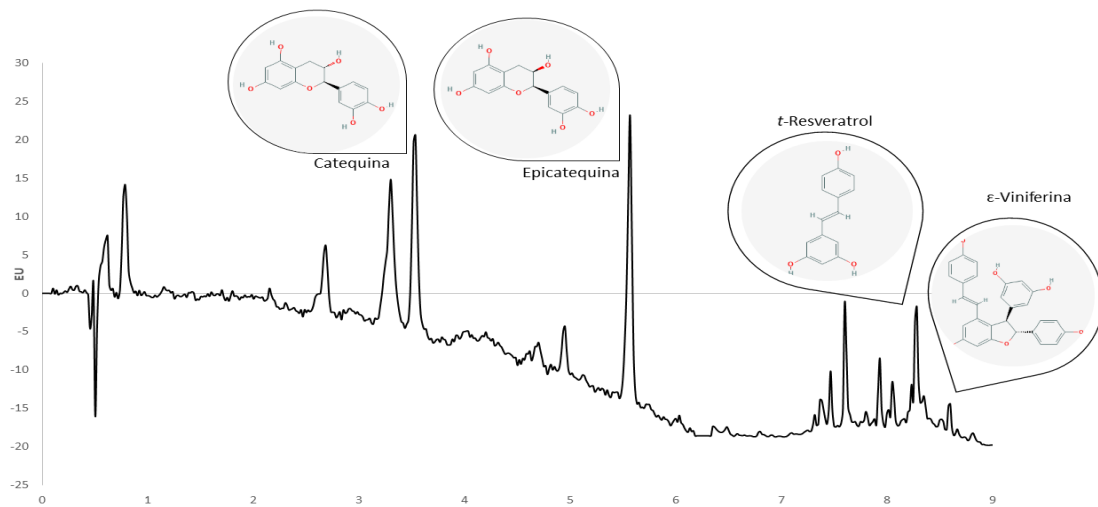
Anexo 8d. Cromatograma de uva a 350 nm mediante UHPLC-DAD.



Anexo 8d. Cromatograma de uva a 370 nm mediante UHPLC-DAD.



Anexo 8f. Cromatograma de uva mediante UHPLC-FLR (λ_{ex} 250 nm y λ_{em} 395nm).



Anexo 8g. Cromatograma de uva mediante UHPLC-FLR. (λ_{ex} 290 nm y λ_{em} 310; λ_{ex} 310 nm y λ_{em} 403 nm).

**Anexo 9.** *Tabla de cargas (loading) para PCA.*

Variable	PC1	PC2	PC3
calibration	25.47299	40.77217	51.92283
verification	18.64447	29.57627	33.16223
Ácido gálico	2.088942	47.07508	48.27754
Procianidina B ₂	15.70949	20.80293	21.31585
Ácido protocatéuico	3.336008	76.78915	78.37688
Ácido caftárico	3.64521	4.051369	4.057338
Ácido cafeico	13.73772	44.68901	45.81255
Quercetina 3- <i>O</i> -galactósido	52.03001	53.35746	54.68522
Quercetina 3- <i>O</i> -glucósido	48.57142	51.18774	51.6045
Quercetina 3- <i>O</i> -rhamnósido	58.63387	58.63432	62.2677
Kaempferol	51.93381	64.99036	65.00597
Catequina	0.8488964	0.9712368	1.416448
Epicatequina	0.8782255	9.45707	9.458467
<i>t</i> -Piceido	0.5556231	7.704156	10.31604
<i>t</i> -Resveratrol	6.574693	6.807924	70.21569
ε-viniferina	3.537282	4.227838	63.72761
EGCG	0.5973443	0.7485929	14.24389
Procianidina A ₂	3.450775	5.145562	56.40411
Procianidina B ₁	0.2705101	2.87169	2.893065
Total	4.362708	7.98121	11.54582

Anexo 10. *Variedades de uvas, color de la piel, tipo de uva y clasificación por flavonoides y estilbenos.*

Nombre de la variedad de uva	Color de la piel	Tipo de uva	Clase según estilbenos	Clase según flavonoides
SUPERZIBIBBO	Blanca	Mesa	0	4
DER-G-25-26-27		Mesa	1	1
PARRALETA	Negra	Vino	1	4
BONARDA	Negra	Vino	1	8
LIVAL	Negra	Mesa	1	8
X1		Mesa	1	8



SCARLET	Negra	Mesa	1	9
KALILI	Blanca	Mesa	2	0
TRBLJAN	Blanca	Mixta	2	0
BLACK MONUCCA	Negra	Mesa	2	3
BRUNI 045	Blanca	Mesa	2	3
CICLOPICA	Blanca	Mesa	2	3
FERNAO PIRES	Blanca	Vino	2	3
RIESLING ITALICO	Blanca	Vino	2	3
RODI	Blanca	Mesa	2	3
BRUNI 125	Negra	Mesa	2	4
EZEREVES MAGYARORSZAG EMLEKE	Blanca	Mixta	2	4
KOKUR	Blanca	Vino	2	4
MADELEINE ANGEVINE	Blanca	Mesa	2	4
MALVASIA AROMATICA	Blanca	Vino	2	4
MARENCO	Blanca	Mesa	2	4
CHARDONNAY	Blanca	Vino	2	5
NYMRANG	Rosa	Mesa	2	5
CHASSELAS DORÉ	Blanca	Mesa	2	6
DELIGHT	Blanca	Mesa	2	7
MUSCAT ST. LAURENT	Blanca	Mesa	2	7
AUXÉRROIS	Rosa	Vino	2	8
BERMEJUELA	Blanca	Vino	2	8
FORASTERA	Blanca	Vino	2	8
GENERAL DE LA MARMORA	Blanca	Mesa	2	8
LUGLIENGA BIANCA	Blanca	Mesa	2	8
PIROVANO 166A	Blanca	Mesa	2	8
PORTAN	Negra	Vino	2	8
PRIMIERA	Blanca	Mesa	2	8
PROSPERI 008	Blanca	Mesa	2	8
TIBOUREN	Negra	Vino	2	8
TOMPA MIHALY	Blanca	Mesa	2	8
TORRONTÉS	Blanca	Vino	2	8
X2		Mesa	2	8



X3	Rosa	Mesa	2	8
Blanca D'AMBRE	Blanca	Mesa	2	9
MANSENG VERT	Blanca	Vino	2	9
MARROO SEEDLESS	Negra	Mesa	2	9
MAZEL	Blanca	Mixta	2	9
PERLETTE	Blanca	Mesa	2	9
IZQ-C-15-16-17		Mesa	3	4
BRUÑAL	Negra	Vino	3	8
DER-B-25-26-27		Mesa	4	0
AGIORGITIKO	Negra	Vino	4	2
EMERALD SEEDLESS	Blanca	Mesa	4	3
NERO D'AVOLA	Negra	Vino	4	3
FOSTERS WHITE SEEDLING	Blanca	Mesa	4	4
ORANGE MUSCAT	Blanca	Mesa	4	4
SULTANINA	Blanca	Mesa	4	4
TRINCADEIRA PRETA	Negra	Vino	4	4
X5	Rosa	Mesa	4	4
ABORIOU	Negra	Vino	4	5
TARRANGO	Negra	Vino	4	6
VRANAC	Negra	Vino	4	6
CARMENERE	Negra	Vino	4	8
CASTAÑAL	Negra	Vino	4	8
CHAOUCH Rosa	Rosa	Mesa	4	8
DUC DE MAGENTA	Negra	Mesa	4	8
FETEASCA NEAGRA	Blanca	Vino	4	8
MATRASSA	Negra	Vino	4	8
MOLINERA	Roja	Mesa	4	8
RED GLOBE	Roja	Mesa	4	8
THALLOCY LAJOS	Blanca	Mesa	4	8
X4	Roja	Mesa	4	8
DONA MARIA	Blanca	Mesa	4	9
DURIF	Negra	Vino	4	9
SAUVIGNON Blanca	Blanca	Vino	5	0
VERMANSERG VERT	Blanca	Vino	5	0



X6	Roja	Mesa	5	0
GAMAY	Negra	Vino	5	3
LADY DOWNE'S SEEDLING	Negra	Mesa	5	3
CAIÑO BlancaO	Blanca	Vino	5	4
SABRO	Blanca	Vino	5	4
BARBABLEU	Negra	Mesa	5	5
DANLAS	Blanca	Mesa	5	5
EL FARRYALI	Negra	Mesa	5	5
TRIESTE	Blanca	Mesa	5	5
PERLANERA	Negra	Mesa	5	7
PETIT VERDOT	Negra	Vino	5	7
ALBARIÑO	Blanca	Vino	5	8
ARVINE PETITE	Blanca	Vino	5	8
DALMASSO VI-03	Blanca	Mesa	5	8
HONDARRIBI ZURI	Blanca	Vino	5	8
MÜLLER-THURGAU	Blanca	Vino	5	8
PARDUCA	Roja	Vino	5	8
TEBRIZI	Blanca	Mesa	5	8
CABERNET SAUVIGNON	Negra	Vino	5	9
SELECCION BRUNI 1	Blanca	Mesa	6	3
ALIGOTE	Blanca	Vino	6	4
PEDROL	Negra	Vino	6	5
CROATINA	Negra	Vino	6	8
DER-N-26-27-28		Mesa	7	0
DIMYAT	Blanca	Mesa	7	3
AGUA SANTA	Negra	Vino	7	4
GRACIANO	Negra	Vino	7	4
TETA DE VACA	Negra	Mesa	7	4
GANSON	Negra	Vino	7	8
CORINFESTO	Negra	Vino	7	9
PATAGONIA	Blanca	Mesa	8	0
DER-C-28-29-30		Mesa	8	1
ITALIA X SULTANINA	Blanca	Mesa	8	1
CATALANESCA BIANCA	Blanca	Mesa	8	2



FETEASCA REGALA	Blanca	Vino	8	2
GEWURTZTRAMINER	Roja	Vino	8	2
LISTAN PRIETO	Nega	Mesa	8	2
PRECOCE DE MALINGRE	Blanca	Mesa	8	2
SAPERAVI	Negra	Vino	8	2
THERMI	Negra	Mesa	8	2
X9		Mesa	8	2
FLAME SEEDLESS	Roja	Mesa	8	3
LUISA BlancaA	Blanca	Mesa	8	3
MALVASIA ISTRIANA	Blanca	Vino	8	3
MATHIASZ JANOSNE	Rosa	Mesa	8	3
PIROVANO 28	Blanca	Mesa	8	3
PIROVANO 620	Rosa	Mesa	8	3
ALBA MAGNA	Blanca	Mesa	8	4
ALJIBE	Blanca	Vino	8	4
ANGIOLA BIANCA	Blanca	Mesa	8	4
ASSIRTICO	Blanca	Vino	8	4
CHASAN	Blanca	Vino	8	4
CILIEGUIOLO NERO	Negra	Mesa	8	4
CRYSTAL	Blanca	Mesa	8	4
CUATENDRA	Negra	Vino	8	4
MALVASIA VOLCANICA	Blanca	Vino	8	4
MARIA ROSA	Rosa	Mesa	8	4
MUSCADELLE	Blanca	Mesa	8	4
PINOTAGE	Negra	Vino	8	4
PROSPER I/02	Blanca	Mesa	8	4
SANGIOVESE	Negra	Vino	8	4
TALISMANO	Blanca	Mesa	8	4
TINTA BARROCA	Negra	Vino	8	4
VINYATER	Blanca	Vino	8	4
X11		Mesa	8	4
FURMINT	Blanca	Vino	8	5
AURORA	Blanca	Mesa	8	6
BRUNI 041	Blanca	Mesa	8	6
PIRIQUITA	Negra	Mixta	8	6



PRECOCI DI ROMA	Blanca	Mesa	8	6
ALBILLO DE ALBACETE	Blanca	Vino	8	8
ATALAYA	Blanca	Mesa	8	8
AUGUSTA	Blanca	Mesa	8	8
BARESANA	Blanca	Mesa	8	8
CAILLABA	Blanca	Vino	8	8
COARNA BIANCA	Blanca	Mesa	8	8
ELBLING WEISS	Blanca	Vino	8	8
FETEASCA NEAGRA	Negra	Vino	8	8
KOKORKO	Blanca	Vino	8	8
LASINA	Negra	Mesa	8	8
MALVASIA CARDIA AROMATICA	Blanca	Vino	8	8
MOSCATO DI TERRACINA	Blanca	Mesa	8	8
Negra GLADY	Negra	Mesa	8	8
PAMID	Roja	Mixta	8	8
PORTUGUESA AZUL	Negra	Mixta	8	8
PRUNELLA	Blanca	Mesa	8	8
QUEEN	Roja	Mesa	8	8
RABIGATO	Blanca	Vino	8	8
RIESLANER	Blanca	Vino	8	8
ROUSSANNE	Blanca	Vino	8	8
RUTILIA	Blanca	Mesa	8	8
SCHEUREBE	Blanca	Vino	8	8
SILVANER	Blanca	Vino	8	8
TOCAI FRIULANO	Blanca	Vino	8	8
X10		Mesa	8	8
X12		Mesa	8	8
X13		Mesa	8	8
X15	Rosa	Mesa	8	8
X16	Blanca	Mesa	8	8
X17	Rosa	Mesa	8	8
X18	Rosa	Mesa	8	8
X19	Rosa	Mesa	8	8
X7		Mesa	8	8



X8	Rosa	Mesa	8	8
ZILAVKA	Blanca	Vino	8	8
ZWEIGELTREBE BLAU	Roja	Vino	8	8
ALBILLO REAL	Blanca	Vino	8	9
BRUNI 415	Blanca	Mesa	8	9
CORNICHON VIOLET	Negra	Mesa	8	9
VIVONA 378	Blanca	Mesa	8	9
X14		Mesa	8	9
BLAUFRANKISCH	Negra	Vino	9	0
KUJUNDZUSA	Blanca	Vino	9	0
X21		Mesa	9	0
TROBAT	Negra	Vino	9	2
AGOSTENGA	Blanca	Mesa	9	3
MALBEC	Negra	Vino	9	3
NEGRO AMARO	Negra	Vino	9	3
BRUNI 102	Negra	Mesa	9	4
RED OHANES	Roja	Mesa	9	4
TSCHETIRBAK	Blanca	Mixta	9	4
BEAUTY SEEDLESS	Negra	Mesa	9	7
BRUNI 100	Blanca	Mesa	9	7
DELHRO	Negra	Mesa	9	7
ALIGOTE	Blanca	Vino	9	8
GRAZIELLA	Blanca	Mesa	9	8
MENCIA	Negra	Vino	9	8
SEMILLON	Blanca	Vino	9	8
X20		Mesa	9	8
DALMASSO XVIII-03	Negra	Mesa	9	9



Anexo 11

Lista de acrónimos y siglas

- **ECG**: Epicatequina galato.
- **EGCG**: Epigallocatequina galato.
- **Espectroscopia UV-Vis**: Espectroscopía ultravioleta-visible.
- **CL**: Cromatografía líquida.
- **HPLC**: Cromatografía líquida de alta eficacia (High performance liquid chromatography).
- **UHPLC**: Cromatografía líquida de ultra eficacia (Ultra-high performance liquid chromatography).
- **DAD**: Detector de matriz de fotodiodos (Diode-array detector).
- **FLR**: Fluorescencia.
- **MAE**: Extracción asistida por microondas (Microwave assisted extraction).
- **CA**: Análisis de Clúster (Cluster analysis).
- **PCA**: Análisis de componentes principales (Principal component analysis).