

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS

PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE 3,5,4'-TRANS
TRIHIDROXIESTILBENO (TRANS-RESVERATROL) POR
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN EN VINOS TINTOS
BORGOÑA PERUANOS - 2012**

Tesis presentada por:

LA BACHILLER. COIMBRA LLERENA KARLA KATHERINE

Para optar el Título Profesional de:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

Asesor: PhD. José Villanueva Salas

AREQUIPA - PERÚ

2013

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Católica de Santa María y al programa profesional de Farmacia y bioquímica por viabilizar mi formación intelectual.

Agradezco a todos aquellos que hicieron posible mi proceso de titulación, a mi asesora guía, PhD. José Villanueva Salas, quien con su apoyo constante y conocimientos facilitados, pude desarrollar ésta tesis, como también a las personas que integran el grato ambiente del “Laboratorio de investigación Proyecto Mercurio”.

También deseo brindar mis agradecimientos a aquellas personas que han estado a mi lado apoyándome incondicionalmente durante toda mi vida, mi familia, en especial a mi madre Carla, quien me enseñó que con esfuerzo y sacrificio se alcanzan las metas, a mi padre José Luis.

No puedo dejar de mencionar y agradecer a quienes he ido encontrando en este largo camino, aprendiendo de cada uno, entregando la mejor de sus voluntades y deseos, para el logro de mis propósitos y permitir que sea una mejor persona, mis amigos.

Y a quien me dio la confianza de creer en mí misma, quien siempre me tomó de su mano y nunca me soltó, a mi Dios Padre.

RESUMEN

Últimos estudios realizados aportan en sus investigaciones que el consumo moderado de vino, contribuye a la prevención y minimización de enfermedades cardíacas y neurodegenerativas, debido principalmente a la concentración elevada de compuestos fenólicos, que hacen parte de la composición del vino y consecuentemente a su elevada capacidad antioxidante; por tal razón se han ido desarrollando metodologías analíticas orientadas al análisis del vino. El *trans*-resveratrol, es un polifenol, que pertenece a la clase de los estilbenos, que se encuentra presente en mayor cantidad en vinos tintos que en vinos blancos. El *trans*-resveratrol en diversos estudios realizados, ha mostrado in vivo, un efecto antioxidante con LDL, antiagregante plaquetario, antiinflamatorio, antiteratogénico y citostático en un modelo experimental murino. Las propiedades terapéuticas del *trans*-resveratrol están totalmente demostradas, de modo que un consumo moderado de vino se relaciona con una disminución de las enfermedades cardiovasculares.

Se cuantificó el nivel de *trans*-resveratrol en ocho muestras de vinos tinto borgoña peruanos, por cromatografía líquida de alta resolución, utilizando cartuchos de extracción en fase sólida (SPE). Las condiciones cromatográficas fueron diseñadas en la presente tesis, para obtener señales óptimamente cuantificables. Se realizó la validación de la metodología, encontrándose valores de linealidad, exactitud, precisión, límites de detección y cuantificación, dentro de las especificaciones, siendo de ésta forma un método confiable para la cuantificación de *trans*-resveratrol en muestras de vinos. Al aplicarse la metodología diseñada, se obtuvieron concentraciones medias de *trans*-resveratrol de 2,18 mg/L, y como concentraciones máximas y mínimas de 3,27 mg/L y 1,63 mg/L respectivamente, siendo el vino tinto borgoña Paz Soldán que presentó el nivel máximo y el vino tinto borgoña Quenta el nivel mínimo de *trans*-resveratrol hallado en la presente investigación. A su vez se probó que los cartuchos para SPE son reusables tres veces como mínimo para la extracción del estándar de *trans*-resveratrol y dos veces como mínimo para muestras de vino tinto borgoña

ABSTRACT

Recent studies provided, that consume of centrist wine, contribute to the prevention and minimization heart and neurodegenerative diseases mainly, due to high concentration of phenolic compounds, that make part from wine composition, and consequently to their high antioxidant capacity, for that reason, it had developed analytical methodologies, to orient at wine's analysis. The trans-resveratrol is a polyphenol, which belong to stilbens family; it is present in red wines more than white wines. The trans-resveratrol in the various studies accomplished, have shown it has antioxidant with LDL anti-inflammatory, anti-teratogenic and cytostatic in a murin experimental model. The therapeutic properties of trans-resveratrol are fully demonstrated, so that moderate consumption of wine is associated with a decrease in cardiovascular diseases.

We quantified the level of trans-resveratrol in red wine samples eight burgundy Peruvians, by high resolution liquid chromatography, cartridges using solid phase extraction (SPE). The chromatographic conditions were designed in this thesis to obtain measurable signals optimally. We performed the validation of the methodology, meeting linearity, accuracy, precision, detection and quantification limits, within specifications, thus being a reliable method for the quantification of trans-resveratrol in wine samples.

When applying the methodology designed, mean concentrations were obtained trans-resveratrol of 2.18 mg / L, and a maximum and minimum concentrations of 3.27 mg / L and 1.63 mg / L respectively, with burgundy red wine Paz Soldan presented the maximum and red wine burgundy Quenta minimum level of trans-resveratrol found in this investigation. In turn tested for SPE cartridges that are reusable for at least three times the standard extraction of trans-resveratrol and for at least twice burgundy wine samples.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	Pag.
 CAPITULO I	
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVOS	4
MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. RESEÑA HISTÓRICA DEL VINO EN EL PERÚ Y UVA BORGOÑA	6
1.2. PRODUCCIÓN GENERAL DEL VINO	7
1.3. PROPIEDADES TERAPÉUTICAS DEL VINO	9
1.4. PRINCIPALES COMPONENTES DEL VINO	10
1.4.1. Trans- resveratrol	14
1.4.1.1. Características químicas del <i>trans</i> -resveratrol	15
1.4.1.2. Biosíntesis de <i>trans</i> -resveratrol.....	16
1.4.1.3. Metabolismo y Biodisponibilidad del <i>trans</i> -resveratrol.....	19
1.4.1.4. Efecto quimio-protector	20
1.5. METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE TRANS-RESVERATROL	22
1.6. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	22
1.6.1. Fundamento de separación.....	23
1.6.2. Instrumentación.....	28
1.7. VALIDACIÓN ANALÍTICA.....	32
1.7.1. Linealidad	32
1.7.2. Exactitud	33
1.7.3. Precisión.....	34

1.7.4.	Limite de detección.....	34
1.7.5.	Limite de cuantificación.....	35

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS	36
2.1. AMBIENTE UTILIZADO	37
2.2. MATERIALES	37
2.2.1. Muestras	37
2.2.2. Equipos	38
2.2.3. Reactivos.....	38
2.2.4. Materiales de laboratorio	39
2.3. MÉTODO	39
2.3.1. Optimización de condiciones cromatográficas	40
2.3.2. Validación de la técnica analítica.....	45
2.3.2.1. Linealidad	45
2.3.2.2. Exactitud	45
2.3.2.3. Limite de detección.....	46
2.3.2.4. Limite de cuantificación.....	46
2.3.3. Determinación cuantitativa de <i>trans</i> -resveratrol por HPLC	46
2.3.3.1. Elaboración de la curva de calibración	46
2.3.3.2. Extracción en Fase Sólida de <i>trans</i> -resveratrol en muestras de vinos	50
2.3.4. Uso de Cartuchos para Extracción en Fase Sólida (SPE)	52

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
3.1. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA	56
3.1.1. Linealidad	56
3.1.2. Exactitud	71
3.1.3. Precisión.....	75
3.1.4. Limite de detección y cuantificación	77
3.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TRANS-RESVERATROL POR HPLC	79
3.3. USO DE CARTUCHOS PARA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE).....	83
CONCLUSIONES.....	¡Error! Marcador no definido.
RECOMENDACIONES.....	¡Error! Marcador no definido.
BIBLIOGRAFÍA	¡Error! Marcador no definido.
ANEXOS	104

INTRODUCCIÓN

El resveratrol es uno de los principales antioxidantes presentes en el vino, siendo el más estudiado en los últimos años.

El resveratrol presenta dos formas isoméricas (*trans* y *cis*), siendo el isómero *trans* el que se encuentra en mayores concentraciones en los vinos y al que se le atribuye las propiedades terapéuticas [21]. El polifenol *trans*-resveratrol (3,5,4'-*trans*-trihidroxiestilbeno), es una fitoalexina presente en una amplia variedad de especies de plantas, incluyendo moras, cacahuates y uvas [41][28][18][67]. Esta fitoalexina es encontrada en moderadas concentraciones en vinos, particularmente en vinos tintos [23]. El efecto benéfico del consumo del vino en la enfermedad coronaria, ha sido atribuido a sus propiedades antioxidantes [25].

El vino es un producto que se caracteriza por presentar nutrientes indispensables para el buen funcionamiento del organismo humano, tales como vitaminas (B1, B2 y B12), aminoácidos (lisina, fenilalanina, triptófano y ácido glutámico) y especies antioxidantes [64].

El *trans*-resveratrol viene siendo muy estudiado en los últimos años, en razón de su acción preventiva relacionada a enfermedades como son el cáncer, la arterioesclerosis, reumatismo y dolencias degenerativas, es por ello que se han propuesto varias metodologías para la determinación cuantitativa de *trans*-resveratrol.

La cuantificación del *trans*-resveratrol en vinos se acostumbra realizar por técnicas de cromatografía en fase líquida, asociada a diferentes detecciones.

En la presente tesis de investigación, la cuantificación del *trans*-resveratrol en vinos tintos se realizó por cromatografía líquida de alta resolución, asociada a un detector UV. De los diversos vinos tintos elaborados en Perú, se analizaron ocho del tipo borgoña, ya que la uva borgoña, en realidad uva Isabela, es una cepa de origen

nacional utilizada como materia prima para la elaboración de vinos tinto borgoña nacionales.

Los niveles de *trans*-resveratrol en vinos tinto borgoña peruanos hallados en ésta investigación aportarán valores confiables y referenciales, así como también la metodología diseñada podrá contribuir posteriormente a desarrollos de protocolos de control de calidad, los cuales pueden ser parte de un análisis de rutina.



HIPÓTESIS

Dado que los vinos tintos, presentan cierto contenido en *trans*-resveratrol, es probable que usando la metodología SPE en vinos tinto borgoña peruanos, se cuantifique los niveles de *trans*-resveratrol por cromatografía líquida de alta resolución.


OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Realizar la determinación cuantitativa del *trans*-resveratrol en vinos tintos borgoña peruanos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer las condiciones cromatográficas bajo las cuales se realizará la cuantificación del *trans*-resveratrol.
- Validación del procedimiento analítico para la cuantificación de *trans*-resveratrol en los vinos tintos borgoña.
- Verificar si los cartuchos para extracción en fase sólida son reusables.



**CAPITULO I:
MARCO TEÓRICO**

1.1. RESEÑA HISTÓRICA DEL VINO EN EL PERÚ Y UVA BORGOÑA

Entre 1532 y 1580 se fundaron en el Perú más de 700 centros poblados, entre ciudades, villas y pueblos. Cada vecino o morador recibió un solar para su vivienda y tierras para el cultivo de plantas y crianza de ganados. De inmediato se cultivaron los "frutos de Castilla", entre ellos la vid. En 1550 la crónica registra cultivos de la vid en varias regiones del Perú, especialmente en la costa. En 1560 ya se comercializaba los "vinos de la tierra" considerados como buenos y muy buenos. A fines del siglo en referencia, ya se producía aguardiente de uva que se embarcaba por el puerto de Pisco. En el siglo XVII ambos productos logran gran distinción. Razones sociales y naturales contribuyeron a la decadencia de ambas bebidas; pero a mediados del siglo XX se produce la revitalización. Los viticultores buscan primero mejorar la calidad y luego expandir la frontera vitivinícola. En la actualidad, tanto el vino como el pisco peruano han recobrado el viejo prestigio y se han hecho acreedores de premios nacionales e internacionales [43].

Las zonas productoras de uva en nuestro país se encuentran ubicadas principalmente en la costa sur y corresponden a Lima, Ica, Arequipa, Moquegua y Tacna; cuya temporada de cosecha se efectúa entre los meses de noviembre y febrero. En la costa norte la zona de producción de uva se encuentra en el valle de Cascas, provincia de Trujillo, región de La Libertad [30]. Al 2008 la región Ica posee el mayor porcentaje de producción de uva en el país debido principalmente a las favorables condiciones agronómicas para este cultivo, el uso de tecnología y la mayor capacidad de gestión empresarial [30].

En nuestro país la uva, variedad Isabela (*Vitis Labrusca*) es conocida como uva borgoña, en Argentina como uva chinche, en Uruguay como frutilla brasileña napolitana, en Brasil uva nacional y en Venezuela como criolla negra [86].

En la elaboración de los vinos tintos el estado de maduración de las uvas es de importancia capital, ya que del contenido de azúcares y ácidos dependerá el

desarrollo adecuado de la fermentación y el contenido polifenólico (antocianos y taninos, el color y la capacidad de crianza). Las características de las uvas dependen de la variedad, pero las condiciones edafoclimáticas influyen decisivamente de manera que una misma vinífera, en similar grado de maduración, cultivada en dos zonas diferentes puede dar lugar a vinos diferentes [27].

Uno de los mayores parámetros de significación tecnológica y nutricional en las uvas (*Vitis sp.*) es la composición de polifenoles. Los compuestos fenólicos de las uvas determinan la sensación de astringencia y el color de los vinos tintos. Muchas investigaciones del campo de la enología estudian los compuestos fenólicos con el propósito de mejorar la calidad del vino y conocer propiedades de interés nutricional y farmacológico [42]. En un estudio realizado se comprobó la actividad antioxidante y antiinflamatoria de dos extractos de la variedad *V. labrusca*, dichas actividades presentaron una correlación significativa con el contenido de compuestos fenólicos de los extractos, sugiriendo que éstos pueden contribuir, significativamente, a la actividad biológica estudiada [66].

1.2. PRODUCCIÓN GENERAL DEL VINO

La principal transformación que sufren los mostos en su evolución a vino, es la fermentación alcohólica llevada a cabo por la acción de levaduras. Sin embargo, no son estos los únicos microorganismos que intervienen en la obtención de vinos de calidad. En especial en los vinos tintos que proceden de regiones frías, donde la maduración de la uva no es completa, su acidez se ve amortiguada mediante una segunda fermentación a la que se denomina fermentación maloláctica llevada a cabo por las bacterias lácticas. En esta segunda se produce el paso de ácido málico (dicarboxílico) a ácido láctico (monocarboxílico) con la consiguiente disminución en acidez total. La fermentación maloláctica puede emplearse como

un método natural de reducción de la acidez del vino y por ello se considera generalmente deseable y es estimulada en regiones productoras de uvas ácidas.

Este proceso va acompañado de una serie de reacciones secundarias que, convenientemente controladas redundan en un vino estable, con una notable mejora de sus características organolépticas [63].

Durante el proceso de la fermentación alcohólica existe una competencia entre levaduras y bacterias lácticas por los nutrientes del mosto, viéndose afectada esta competencia por la evolución de los distintos parámetros físico-químicos a lo largo de la fermentación alcohólica. La fermentación maloláctica no es completamente deseable o indeseable en términos absolutos. Su favorecimiento o inhibición dependerá del mosto de partida, de la cepa, de las condiciones ambientales y sobre todo, del tipo de vino que se pretenda conseguir. En general la inhibición de este proceso es relativamente sencilla si se toman las medidas higiénicas convenientes como pueden ser un sulfitado adecuado, un menor contacto del mosto con las lías, etc. De hecho ésta es la práctica más extendida en las vinificaciones de Rioja, zona en la que hasta el momento la presencia de bacterias lácticas en vino era contemplada como un posible factor de alteración y no como un agente estabilizador potencial, cuya acción controlada conllevaría una mejora de las características organolépticas del vino. Sin embargo, aunque esta inhibición puede ser de gran interés en la producción de determinados tipos de vino, la impredecibilidad de una fermentación maloláctica espontánea ha llevado a numerosos investigadores al estudio de los mecanismos de control de la misma, así como las condiciones en las cuales se obtenga una fermentación maloláctica limpia. Hoy en día, la tendencia enología es la de permitir o incluso favorecer la realización de la fermentación maloláctica controlada con objeto de conseguir la estabilización del vino [63].

1.3. PROPIEDADES TERAPÉUTICAS DEL VINO

La Clasificación Internacional de Enfermedades establece como un consumo aceptable y no peligroso dosis límite de alcohol puro de 24 g/día para el varón y de 16 g/día para la mujer. El riesgo o consumo excesivo se entiende cuando es superior a 40 g/día para el varón y mayor de 24 g/día para la mujer o relacionados con las circunstancias de riesgo del alcohol para el usuario. Se consideran concentraciones de vino o alcohol no excesivas aquellas que estén por debajo de los 40 g/día (280 g/semana) para el varón y 24 g/día (168 g/semana) para la mujer, lo que equivale aproximadamente a 400 ml de vino de 12 grados al día en el varón y a 250 ml al día en la mujer [9].

Una de las diferencias existentes entre el vino tinto y el blanco es la concentración de polifenoles; así, ésta en el vino tinto es 6-20 veces superior a la del vino blanco. Entre los mecanismos fisiopatológicos que explican el papel protector del consumo moderado de alcohol está el aumento de las lipoproteínas de alta densidad (HDL2 y HDL3) y de las apolipoproteínas A-I y A-II. Para algunos autores este mecanismo explicaría sólo una reducción del 30-50% del riesgo de ECV [9].

Las propiedades antioxidantes del vino se han atribuido a sus componentes polifenólicos. Numerosos estudios in vitro demuestran el efecto protector del vino tinto sobre la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad [13] [16], lo que podría explicar su efecto in vivo. Tanto las evidencias epidemiológicas como los resultados obtenidos de los análisis realizados, justifican y avalan la recomendación y una adecuada educación de la población acerca del consumo moderado de vino tinto como parte de una dieta saludable [20]

Varios estudios demuestran que el consumo moderado de alcohol (30-50 g/día) disminuye el riesgo de enfermedad cardiovascular [12]. Se han propuesto diversos mecanismos para explicar este efecto. Parece ser que el alcohol produce un aumento de las concentraciones del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad

(cHDL) implicadas en el transporte inverso del colesterol. Algunos autores han relacionado este aumento con una disminución de la actividad de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP); sin embargo, otros no detectan un cambio de esta enzima tras la ingestión de alcohol. Este último también se ha relacionado con una reducción de la agregación plaquetaria y de la concentración de fibrinógeno en circulación [57]. En un estudio realizado en Perú, sobre el efecto del vino, se obtuvo como resultado que el vino tinto malbec peruano, aumento HDL y redujo el índice de riesgo cardiovascular sobretodo en mujeres [22].

1.4. PRINCIPALES COMPONENTES DEL VINO

La composición de las diferentes bebidas alcohólicas es diferente y, por tanto, los efectos benéficos probablemente también. Sirva como ejemplo la concentración de polifenoles del vino como resveratrol y quercetina[10]

La composición del vino es compleja. La mayoría de sus componentes provienen de la uva y del proceso fermentativo. Los compuestos polifenólicos de la uva se encuentran en la piel, sobre todo en las células epidérmicas y en las semillas, y su concentración es muy baja en la pulpa. La concentración y variedad de polifenoles en el vino depende de numerosos factores, tales como la variedad de vid, tipo de vino, clima, terreno, cosecha temprana o tardía, procedimientos de prensado de la uva, tiempo de fermentación del mosto con la piel y las semillas, etc.[29].

El vino es una materia viva compleja que evoluciona cambiando sus propiedades y composición según diversos factores, como pueden ser la edad, la exposición al oxígeno, las variedades de uva, el tipo de fermentación, el tiempo y el tipo de madera donde se conserva, etc [20].

El vino se obtiene de la uva, a través de la fermentación alcohólica que modifica la composición de los mostos provocando la desaparición de los azúcares, glucosa y fructosa y la formación de alcoholes junto con productos secundarios tales como los polioles, el glicerol, diversos ácidos orgánicos y numerosos compuestos volátiles que constituyen el aroma[91].

La composición del vino es todavía más compleja que la del mosto, siendo difícil de precisar el número de constituyentes, que se eleva a varias centenas. Las técnicas analíticas de precisión actuales han permitido poner en evidencia sustancias muy a menudo en estado de concentraciones ínfimas, volátiles generalmente, que participan en el aroma del vino, que es de extrema complejidad. En la TABLA N°1 se dan los principales compuestos de los mostos y los vinos, así como sus concentraciones[91].

TABLA N°1.- Composición del mosto y del vino

Composición del mosto y del vino		
	Mostos (g/L)	vinos(g/L)
Agua	700 – 850	750 – 900
Osas	140 – 250	0,1 – 2
Polisacáridos	3 – 5	2 – 4
Alcoholes	-	69 – 121
Polioles	-	5 – 20
Acidos organicos	9 – 27	3 – 20
Polifenoles	0,5	2 – 6
Compuestos nitrogenados	4 – 7	3 – 6
Minerales	0,8 – 2,8	0,6 – 2,5
Vitaminas	0,25 – 0.8	0,2 – 0,7

Fuente: Enología: fundamentos científicos y Tecnológicos de Claude Flanzky.

La composición química del vino oscila, como es comprensible, dentro de amplios límites. Está influida en primer lugar por la composición de la uva, que depende a su vez de la variedad, del suelo, del clima, del tipo de cultivo y de su recolección y después por el tipo de elaboración del vino[92].

Los componentes del vino proceden de la uva directamente y de la transformación de una parte de los compuestos de la uva durante el proceso de elaboración, principalmente durante las fermentaciones (alcohólica y maloláctica [92].

Los componentes mayoritarios son el agua (80-90%) y el etanol (10-16%), siendo este último el que más condiciona el valor nutritivo del vino y el que limita cuantitativamente su consumo. El resto de los componentes, aun siendo fundamentales en la definición de la calidad del vino, o no tienen valor nutritivo reconocido o están en cantidades tan pequeñas [92].

La acidez del vino está directamente relacionada con la composición del mosto, la concentración de potasio y la predominancia del ácido tartárico en relación al ácido málico, así como también tiene participación importante en las características sensoriales y en la estabilidad físico-química y biológica del vino [24].

El sabor ácido de un vino proviene de los ácidos orgánicos que son originarios de la uva, tartárico, málico y cítrico, principalmente y de aquellos que se forman durante la elaboración, succínico, láctico, acético, carbónico, etc. Los ácidos minerales se encuentran sobre todo en forma de sales, fosfatos, sulfatos, etc. de cationes como el potasio, mayoritario en los vinos, sodio, calcio y magnesio. Desde un punto de vista nutritivo tan solo merece destacarse el contenido en hierro, que puede alcanzar concentraciones de 10mg/L, y el de potasio, aunque este se pierde en gran cantidad en forma de tartratos insolubles. El conjunto de los ácidos valorables representa aproximadamente un 0,5-0,8 % expresados como ácido tartárico.

Los principales compuestos fenólicos del vino con capacidad antioxidante son: derivados de ácidos fenólicos, ácidos cinámicos y tirosina, estíbenos y flavonoides [19]. Los polifenoles son en su gran mayoría potentes antioxidantes necesarios para el funcionamiento de las células vegetales, que se encuentran en frutas y verduras, principalmente en uvas, manzanas y cebollas, y en bebidas como el té y el vino [39].

La fracción fenólica del vino es muy importante ya que no solo es responsable de características organolépticas (sabor, color, sabor y astringencia), sino que se le atribuyen posibles efectos antioxidantes con interés biológico. Los compuestos fenólicos tienen un papel muy importante en la calidad de los vinos tintos [17].

La mayor parte pertenecen a la familia de los flavonoides, llegando a constituir hasta un 2-3 % del vino tinto, dependiendo del tipo de uvas empleadas, proceso de vinificación seguido, envejecimiento, etc. Esta fracción está sujeta a cambios profundos a lo largo del tiempo, sus componentes reaccionan con facilidad entre sí y con otras moléculas pudiendo formar compuestos polimerizados. Este es el caso de los antocianos y flavanoles (taninos condensados) que pueden reaccionar y formar estructuras coloreadas más estables que los antocianos sencillos. Por esta razón, en los vinos tintos jóvenes los antocianos representan 80-90% de los flavonoides totales, mientras que en un vino de varios años los antocianos libres han desaparecido casi por completo en beneficio de flavonoides derivados más complejos. En los vinos blancos y rosados la fracción fenólica es muchísimo menor, como consecuencia de la nula o escasa maceración de las partes sólidas del racimo. En los vinos envejecidos en barricas, una parte de los compuestos fenólicos son taninos hidrolizables cedidos por la madera [92].

Los compuestos nitrogenados están en muy pequeña cantidad y sobre todo en forma de moléculas pequeñas ya que los péptidos y proteínas, procedentes de la uva o de la autólisis de las levaduras, precipitan durante el tratamiento de clarificación[92].

Además del etanol, como alcohol principal, se generan en el vino otros alcoholes como glicerina, metanol propanol, butanol. En el vino se encuentran numerosas sustancias volátiles y aromáticas en cantidades pequeñísimas y que son responsables del olor del vino. La mayoría pertenecen a cuatro familias químicas: ácidos, alcoholes, aldehídos y cetonas y esterés. En el vino se han identificado todas las vitaminas del grupo B, en cantidades no destacables [92].

1.4.1. Trans- resveratrol

El trans-resveratrol (3,4',5-trans-trihidroxiestilbeno) es un polifenol no flavonoide perteneciente a la clase de los estilbenos y clasificado como fitoalexina [77].

El trans-resveratrol pertenece al grupo de las fitoalexinas, sustancias químicas de bajo peso molecular capaces de inhibir el progreso de ciertas infecciones y cuya acumulación en las plantas se produce por interacción de éstas con los microorganismos; es decir, su producción es consecuencia de un mecanismo de resistencia a los parásitos y otras condiciones adversas [31]. La concentración de estilbenos en los vinos varía de acuerdo a la variedad, el origen geográfico, el ataque de hongos y el proceso de vinificación y conservación [69]. El resveratrol se encuentra presente en los vinos y varias partes de la uva, incluyendo la piel [70]. En la **FIGURA N° 1** se muestra la estructura molecular del trans-resveratrol.

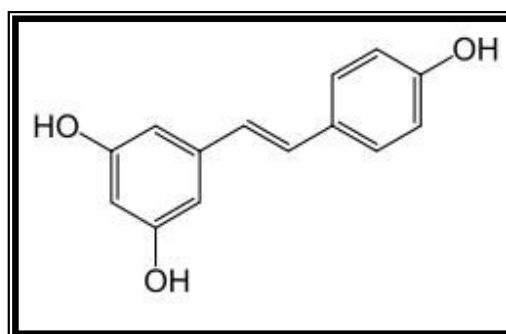


FIGURA N° 1.- Estructura molecular del *trans*- resveratrol

1.4.1.1. Características químicas del *trans*-resveratrol

El resveratrol se encuentra ampliamente extendido en la naturaleza y se conocen multitud de análogos sintéticos o naturales, así como los isómeros, aductos, derivados y conjugados de éstos [6]. Su estructura base consiste en la unión de dos anillos fenólicos por un doble enlace estireno que forman el 3,4',5-trihidroxiestilbeno (peso molecular: 228,25 g/mol). Este doble enlace es el responsable de las formas isoméricas *cis* y *trans* del resveratrol. Sin embargo, el isómero *trans* es la forma más estable desde el punto de vista estérico[8].

Combinando las técnicas de cromatografía líquida de alta resolución con espectrofotometría ultravioleta (HPLC/UV) es posible separar los dos isómeros del resveratrol empleando metanol como solvente, ya que presentan distintas longitudes de onda de absorbancia máxima: 308nm para el *trans*-resveratrol y 288 nm para el *cis* resveratrol [8]. Además, ambos isómeros pueden identificarse claramente por resonancia magnética nuclear [44]. El *trans* resveratrol es un sólido blanco con un punto de fusión de 253-255 °C, mientras que el *cis* resveratrol es un aceite. Los dos isómeros presentan una baja solubilidad en agua, pero son solubles en etanol y dimetilsulfoxido (DMSO).

Trela y Waterhouse estudiaron la estabilidad del resveratrol bajo diferentes condiciones y demostraron que el trans-resveratrol es estable meses cuando se protege de la luz y no se somete a pHs alcalinos. El cis resveratrol es extremadamente fotosensible, pero permanece estable en la oscuridad a temperatura ambiente durante más de un mes cuando se prepara en una solución de etanol al 50% en concentraciones comprendidas entre 5,3-52,8 uM [8]

1.4.1.2. Biosíntesis de *trans*-resveratrol

Resveratrol, 3,4',5-trihidroxiestilbeno es biosintetizado en varias plantas, especialmente como respuesta al estrés. Es particularmente bien conocido como componente en varios vinos rojos, pero también en algunos vinos blancos y otros productos de plantas [80].

La biosíntesis del trans-resveratrol deriva de la ruta del ácido shikimico, que origina los fenilpropanoides, dentro de ellos, la fenilalanina. Inicialmente ocurre por medio de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) la desaminación de la fenilalanina, para producir ácido trans-cinamico, el que por la enzima cinamato 4 hidroxilasa (CA4H), es hidroxilado, para formar ácido p-cumarico [81], como se muestra en la **FIGURA N° 2**.

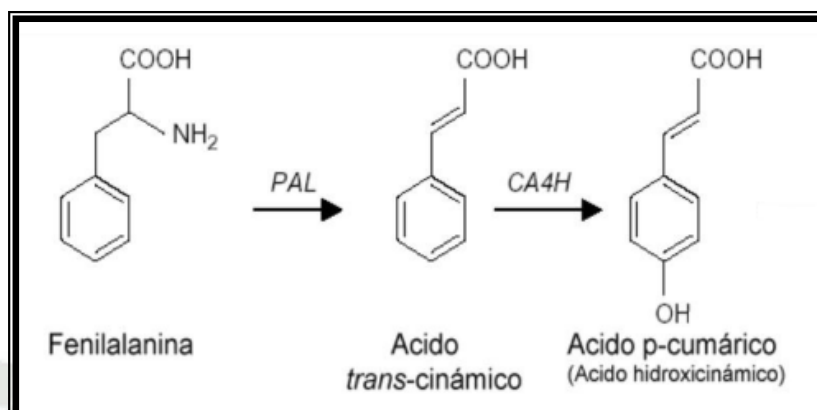


FIGURA N° 2. Origen de la biosíntesis de *trans*-resveratrol.

Por medio de la enzima 4-cumarato-CoA ligasa (4CL), el ácido p-cumarico, es ligado a la Coenzima A. En la siguiente secuencia, el p-cumaril-CoA es condensado con tres moléculas de malonil-CoA, por la enzima estilbeno sinteasa (STS), para formar el *trans*-resveratrol, como se muestra en la **FIGURA N° 3.**

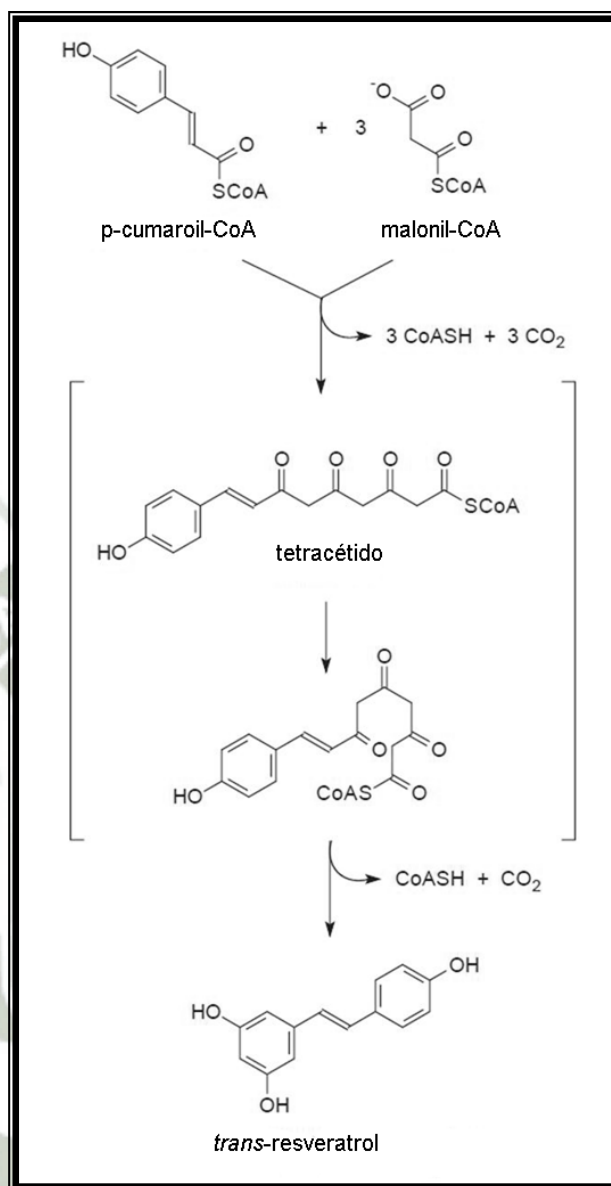


FIGURA N° 3. Biosíntesis de *trans*-resveratrol.

1.4.1.3. Metabolismo y Biodisponibilidad del trans-resveratrol

La biodisponibilidad y el metabolismo del resveratrol han sido ampliamente estudiados tanto en ratas como en humanos. Su eficacia depende de su absorción y metabolismo. Tras una administración oral se detectaron cantidades elevadas de resveratrol en heces, orina y bilis, pero también en plasma, riñones, hígado, estómago e intestino[32][78] que son los órganos donde la biodisponibilidad es mayor. Al igual que sucede con otros polifenoles de la dieta, el resveratrol sufre las reacciones de metabolización de fase II (conjugación) en el hígado, que principalmente dan lugar a la formación de los metabolitos glucurónidos.

[78]. No hay indicios de que el resveratrol sufra reacciones de metabolización de Fase I, dado que se ha localizado su estructura intacta en ciertos órganos [76].

La mayoría de los investigadores coinciden en la baja biodisponibilidad del resveratrol en plasma y tejidos [78][79], sin embargo, Abd El-Mohsen y colaboradores demostraron que el trans-resveratrol fue la forma mayoritaria en hígado, pulmones, corazón y cerebro tras una administración oral [2].

Cabria esperar que una dieta rica en grasas favoreciese la absorción y la biodisponibilidad del resveratrol, ya que se trata de un compuesto lipofílico. Sin embargo, Vitaglione y colaboradores demostraron que la absorción del resveratrol contenido en el vino administrado por vía oral en humanos es independiente del contenido de lípidos en la dieta [75].

1.4.1.4. Efecto quimio-protector

Estudios muestran que el polifenol resveratrol bloquea el proceso de necrosis tumoral del factor alpha (TNF-alpha) pre-mRNA en madurar a mRNA se sugiere que podría ser el resveratrol el que disminuye los niveles de pro-citoquinas inflamatorias in vivo y reduce reacciones inflamatorias en cierta enfermedades inflamatorias [36].

El *trans*-resveratrol presenta propiedades antioxidantes, está relacionado con la prevención de enfermedades cardiovasculares, oxidación de LDL, ciertas enfermedades cancerígenas, longevidad. El piceido es un glicosido derivado del resveratrol con propiedades semejantes en la inhibición de la oxidación de LDL y agregación plaquetaria [31].

El *trans*-resveratrol tiene la capacidad de inhibir lípidos[72]. Los estilbenos muestran un amplio espectro de actividad antioxidante y antiinflamatoria [47]. El *trans*-resveratrol confiere una actividad neuroprotectora in vivo a través de la vía SIRT1-UCP2 similar al IPC [16]. Sir2 e insulina/IGF-1 son las vías principales que inciden sobre el envejecimiento en organismos inferiores. Mostramos que SIRT1 regula positivamente la insulina en la secreción de las células beta pancreáticas [7].

El *trans*-resveratrol desempeña un papel cardioprotector en enfermedades asociada con el estrés oxidativo, protege contra DOX inducida (estrés oxidativo) a través de cambios en la función mitocondrial, específicamente la Sirt1 camino que lleva a la célula cardíaca de supervivencia [39].

La cardioprotección se muestra por reducción del tamaño del infarto y cardiomiocitos [71].

Se dice que el resveratrol es una droga milagrosa verdadera, que ayuda a prevenir la diabetes, la obesidad, y síndrome metabólico

El resveratrol puede abrir un nuevo horizonte de investigación, ya que el *trans*-resveratrol aumenta la longevidad a través de SirT1, que se activa con NAD suministrado por una enzima anti-envejecimiento PBEF. SirT1 interactúa con un factor anti- transcripción de envejecimiento[71][37].

El *trans*-resveratrol inhibe la expresión y la actividad del canal iónico $\text{Na}^{(+)}/\text{H}^{(+)}(\text{NHE-1})$, el cual está asociado a la carcinogénesis [36].

En un estudio el diario tratamiento oral de resveratrol (5 mg/kg de peso corporal peso) a ratas diabéticas durante 30 días demostraron una disminución significativa en la glucosa en sangre y la hemoglobina glucosilada y una disminución significativa en el aumento los niveles plasmáticos de insulina. Además, la administración del resveratrol a ratas diabéticas mejoró el contenido de glucógeno hepático que sugiere el potencial de antihiperlicemia del resveratrol en ratas diabéticas [56].

Los efectos de la administración a largo plazo de resveratrol en un estudio realizado demostraron que ratas obesas Zucker, con síndrome metabólico, con altas concentraciones de triglicéridos, colesterol total, ácidos libres, insulina y leptina en plasma, se redujeron en ratas obesas que recibieron la administración de resveratrol [58].

1.5. METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE TRANS-RESVERATROL

La determinación de trans-resveratrol usualmente es realizada por una extracción líquido/líquido, seguida de una rota-evaporación, hasta la obtención de un residuo sólido [68][46][4][40][33]. Por una disolución, los extractos pueden ser analizados por cromatografía líquida [1][46][45-74], espectrometría de resonancia magnética nuclear [4] y espectroscopia en la región IR [54].

Algunos artículos han sido publicados validando el contenido de *trans*-resveratrol en vinos producidos por diferentes variedades de uvas [26][61][14][50][48][60].

Hay referencias de estudios realizados para la determinación de *trans*-resveratrol en vinos, en dichas metodologías se realizan extracciones en fase sólida para purificar extracciones anteriores o muestras, obteniéndose óptimos resultados[62][82][38][11][53], en algunas otras metodologías se describen procedimientos de inyecciones directas de las muestras, para el caso de determinarse el *trans*-resveratrol por cromatografía líquida de alta resolución[65] [51][21][35] [55] y también se describen procedimientos de extracción líquido/líquido [49][3][52].

1.6. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

Cromatografía líquida de alta resolución es una de las técnicas analíticas más extensamente usada en la industria. Es usada para separar y analizar componentes a través de la transferencia de masa del analito entre la fase estacionaria y fase móvil.

La técnica de Cromatografía líquida de alta resolución, utiliza una fase móvil líquida para separar los componentes de la mezcla. Los componentes primero son disueltos por sí mismos en un solvente forzado a fluir (vía la fase móvil) a través

de una columna (fase estacionaria) bajo alta presión. La mezcla es resuelta en sus componentes dentro de la columna y la cantidad de resolución es dependiente en la interacción entre los componentes del soluto y la fase estacionaria y fase líquida. La interacción del soluto con la fase móvil y estacionaria pueden ser manipuladas a través de diferentes opciones de ambos, solvente y fase estacionaria. [88]

1.6.1. Fundamento de separación

Entre las características de la separación la resolución es la de mayor importancia. En consecuencia será la ecuación de la resolución la que se tomará como punto de partida:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{k'}{k'+1} \right) (\alpha - 1)$$

donde k^0 es el factor de capacidad, N el número de platos teóricos de la columna y α el factor de separación. Como se dijo en su momento, la ecuación 1.1 es la relación fundamental de la cromatografía de líquidos puesto que resume las variables de la separación en tres grupos: retención (k^0), eficacia de la columna (N) y selectividad (α). Cambiando las condiciones de separación, por ejemplo haciendo k^0 más pequeño la resolución disminuirá y aumentando el valor de k^0 la resolución mejorará. Cuando se aumenta α , los tiempos de retención de dos picos consecutivos pueden cambiar de forma distinta aumentando, en cualquier caso, la resolución. Cuando se aumenta la eficacia de la columna, los picos serán más estrechos y la resolución entre ellos será, por tanto, mayor. Por una parte, los valores de k^0 y α serán función de los siguientes factores que regulan el equilibrio de los analitos entre la fase estacionaria y la fase móvil:

- Componentes de la fase móvil
- Componentes de la fase estacionaria
- Temperatura

Por otra parte, los valores de N dependen de las condiciones de la columna:

- Velocidad de flujo
- Longitud de columna
- Tamaño de partícula

A. Variabilidad de la retención (k^0)

La influencia de la fuerza del disolvente es muy importante: mientras que los disolventes fuertes disminuyen la retención, los disolventes débiles ayudan a la retención. Para formar la fase móvil se utilizará como mínimo una mezcla de dos disolventes (A y B) siendo la fuerza de B mayor que la de A.

No solo hay que tener en cuenta la fuerza del disolvente con respecto a su influencia sobre %B sino que también tiene su importancia el tipo de disolvente utilizado. Los disolventes más utilizados son el acetonitrilo, el metanol y el tetrahidrofurano (THF). Entre ellos la sucesión en función de su fuerza es la siguiente:

Agua (el más débil) < metanol < acetonitrilo < etanol < tetrahidrofurano
< propanol < cloruro de metileno (el más fuerte)

B. Variabilidad de la selectividad

Una vez de que hemos fijado la elución de los analitos en el intervalo k^0 hay que adecuar la separación entre los picos con el fin de obtener una

elución lo más selectiva posible. Eso conlleva la optimización de α lo que, como antes se ha dicho, se puede llevar a cabo por medio de cambios en la fase móvil, el empaquetamiento de la columna y/o la temperatura. De las opciones anteriormente citadas el cambio en la fase móvil es la que parece más simple y esto se puede llevar a cabo de dos formas: cambiando la fuerza del disolvente y cambiando el tipo de disolvente

En cuanto a las características de la fase móvil, una de las que tienen más importancia es la polaridad. Por medio de la polaridad se pueden predecir las interacciones que los analitos pueden tener con la fase móvil, el disolvente y/o la fase estacionaria. Es decir, cuando se aumenta la polaridad las interacciones son más fuertes.

C. Eficacia de la columna

Las columnas para HPLC son tubos de acero inoxidable o plástico que poseen una longitud de 5-30 cm y un diámetro interno de 1-5 mm. La tendencia de hoy en día es utilizar columnas cada vez más pequeñas (3-5 cm) y de diámetro interno también cada vez más pequeño (1-2 mm) para de esta forma hacer los tiempos de análisis más cortos. Las columnas capilares (diámetros internos de 180-30 μm) están obteniendo cada vez más fama puesto que reducen el tiempo de análisis y ahorran disolvente. Las columnas son caras y con el material particulado (suciedad) del disolvente o la muestra se pueden degradar fácilmente. En consecuencia, por delante de la columna se coloca una precolumna o una columna pequeña de protección. La precolumna es una columna corta del mismo material que la columna analítica. Puesto que los solutos y partículas finas quedan totalmente pegados, esa precolumna habrá que cambiarla frecuentemente. Los soportes de las fases estacionarias de la HPLC son partículas de sílice. En el mercado se pueden encontrar sílices de distinto

tamaño de partícula, distinta superficie externa y distinto tamaño de poro. Las partículas pueden ser esféricas o irregulares. Las columnas llenas de partículas irregulares tienen una menor eficacia pero son más baratas y se utilizan en cromatografías de pretratamiento. Puesto que por encima de valores de $\text{pH} = 8$ la sílice es soluble en agua, no se puede trabajar por encima de ese pH . Ya hay algunos tipos de sílice aptos para ser utilizados en el intervalo de $\text{pH} 9-10$ y para cromatografiar compuestos básicos en el intervalo de $\text{pH} 8-12$ utilizando soportes poliméricos del tipo del poliestireno. En función de la fase estacionaria, la cromatografía de líquidos se puede clasificar, entre otras, en cromatografía de adsorción, de intercambio de iones, de exclusión por tamaño de partícula y cromatografía de afinidad.

D. Características de la fase estacionaria

El empaquetamiento de la columna tiene su efecto directo en la separación entre los picos. De todas formas, no es muy conveniente mezclar empaquetamientos diferentes en la misma columna aunque se puedan unir unos con otros. En consecuencia, el cambio de la columna trae un cambio simultáneo de la selectividad a diferencia del cambio de la fase móvil. Ese acontecimiento es el que limita la habilidad de la columna para ajustar la separación de muchos componentes. En consecuencia, el cambiar la columna acarrea un readecuamiento de la fase móvil para poder llevar a cabo la separación.

La mayoría de las columnas de la HPLC tienen una fase estacionaria enlazada, es decir, superficies de partículas de sílica con capas orgánicas de revestimiento unidas por enlaces covalentes.

E. Influencia de la eficacia de la columna

Una vez de que se han ajustado las variables analizadas en los apartados anteriores cabe esperar que se obtenga una separación adecuada. De todas formas, como ha quedado demostrado en la ecuación si se aumenta N , manteniendo α y k_0 constantes aumenta la resolución de los compuestos. En consecuencia, una vez ajustados α y k_0 se puede pensar en ajustar el valor de N bien para aumenta la resolución o si ésta fuera muy grande ($R_s > 2$) para acortar los tiempo de elución de la separación. Igualmente, se producirá un aumento del número de platos teóricos en las siguientes condiciones:

- Con un empaquetamiento adecuado de la columna
- Con columnas más largas
- Con flujos bajos (no demasiado bajos)
- Con empaquetamientos de partículas más pequeñas
- Minimizando cualquier efecto exterior sobre la columna

El tamaño de partícula normal para la HPLC es de 3-20 μm . Al disminuir el tamaño de partícula los picos son más estrechos y la resolución aumenta. Al disminuir el tamaño de partícula, disminuye la altura de los platos aunque se aumente el flujo

F. Efecto de la temperatura

Calentando las columnas cromatográficas, en general, disminuye la viscosidad del disolvente y las presiones necesarias para conseguir flujos más rápidos son menores. Al aumentar la temperatura, disminuyen los tiempos de retención y se mejora la resolución puesto que aumenta la

velocidad de difusión del soluto. Por contra, el aumento de la temperatura puede disminuir la vida de la columna. Si no se controla, la temperatura puede cambiar con las condiciones del medio. Manteniendo el horno a una temperatura un grado superior a la del ambiente se puede mejorar la repetitividad de los tiempos de retención así como la exactitud del análisis cuantitativo.

Es conocido que si se aumenta 1 °C de la temperatura la retención (k_0) disminuye en 1 o 2 %. Los cambios en el factor de capacidad pueden tener también su efecto en la selectividad, por lo que la temperatura es un factor a tener en cuenta para ajustar la resolución y la separación. Tomar la temperatura como variable influyente tiene una consecuencia directa: es muy fácil de controlar y no implica cambiar la columna y la fase móvil.

1.6.2. Instrumentación

La instrumentación de la HPLC se puede decir que es flexible. Como se puede ver en la **FIGURA N° 4**, cada elemento puede tener un origen distinto y después de ensamblarlos todos se puede llegar a una situación adecuada para la separación. Como elementos físicos obligatorios, entre otros, están: bomba, portal de inyección, columna y detector. Además de éstos, impregnando la muestra y los analitos, está la fase móvil

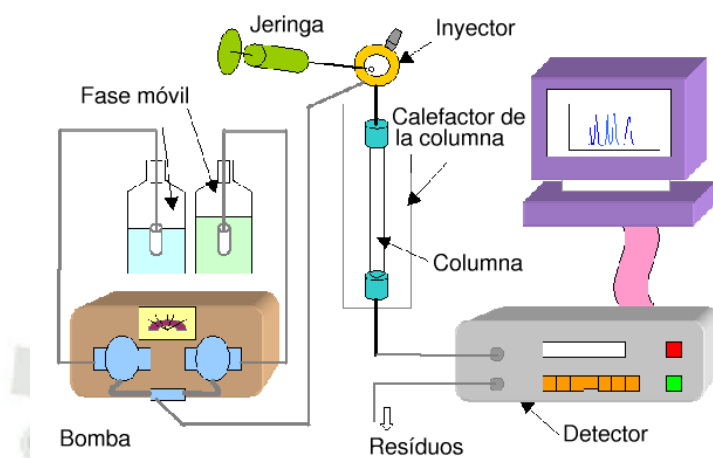


FIGURA N° 4. Esquema de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

A. Fase móvil

Puesto que la fase móvil es una variable que influye en el reparto de los compuestos, su elección es un factor importante. De todas formas, la elección está limitada a la columna. La distinción más importante se da entre las cromatografías de fase normal e inversa. Mientras que en la cromatografía de fase normal los disolventes utilizados son los apolares hexano o iso-octano, en la de fase inversa es típica la utilización de disolventes polares como el agua, el acetonitrilo y el etanol.

En los sistemas de HPLC se puede trabajar de manera isocrática o en gradiente. En la forma isocrática, la composición de la fase móvil permanece constante a lo largo de todo el análisis. Cuando se trabaja en gradiente, la composición de la fase móvil es variada poco a poco a lo largo del análisis. La razón por la que se trabaja en gradiente es porque se mejora la resolución y se reduce el tiempo de análisis.

A la hora de trabajar con la fase móvil, hay que tener en cuenta las siguientes normas:

- Utilización de reactivos de alta pureza, las impurezas pueden provocar

un aumento de la línea base

- La fase móvil no debe de tener partículas
- Se debe eliminar el aire de disuelto de la fase móvil
- Los compuestos volátiles de la fase móvil o solventes, pueden evaporarse, por ello las botellas deben estar cerradas.
- La muestra a analizar debe disolverse en la fase móvil
- La fase móvil no debe reaccionar con la fase estacionaria
- No deben dejarse secar los solventes para HPLC ni la fase móvil.

B. Bombas

Como consecuencia del pequeño tamaño de las partículas de la fase estacionaria, para conseguir un flujo adecuado de la fase móvil hay que trabajar a altas presiones y para obtener dichas presiones es necesario usar bombas. Las bombas para la HPLC han de tener las siguientes características:

- Al igual que la fase móvil deberán ser inertes respecto a disolventes utilizados.
- Han de poder obtenerse flujos sin pulsos del orden de 0.1-10mL/min.
- Han de poder crear presiones por encima de 6000psi

C. Sistemas de inyección

El mecanismo usado para introducir las muestras en la columna suele ser el paso que limita el carácter repetitivo de las medidas. Con el fin de que la columna no se sature, los volúmenes que a inyectar han de ser pequeños y al introducirlos en la columna el sistema no ha de perder presión. De todas formas, este sistema está limitado a presiones máximas de 1500 psi.

En sistema más utilizado en HPLC son las válvulas de inyección que poseen bucles de volumen conocido.

En la posición de llenado la fase móvil pasa directamente a la columna y la muestra se introduce en el bucle de inyección con la ayuda de una microjeringa. Una vez de que el bucle está lleno la válvula gira a la posición de inyección y la fase móvil impulsa la muestra hacia la columna. La desventaja que presenta este sistema se basa en el hecho de que la exactitud de esta inyección se puede alterar con el tamaño del bucle. Los equipos que contienen sistemas de inyección automáticos miden el volumen a través de microjeringas y no a través de bucles. De este modo, en distintas inyecciones pueden entrar masas de analito distintas sin tener que cambiar la concentración del estándar

D. Detectores

El detector ultravioleta (UV) es muy corriente y se puede usar para el análisis de muchos compuestos orgánicos. Los analitos que absorben en la zona UV cuando salen de la columna e interfieren en la trayectoria de la luz, absorben la radiación UV y el detector mide la reducción de la señal.

La capacidad que tienen los analitos de absorber tanto en el visible como en el ultravioleta depende de sus grupos cromóforos. De esta forma, el detector UV se utiliza bastante si los compuestos poseen en su estructura grupos tiol, carbonilo, amina, etilen, acetilen, nitrilo, sulfona, yodo así como heterociclos cromóforos.

Hay distintos tipos de detectores UV. Algunos de ellos solo miden en una única y determinada longitud de onda (en muchos casos 254 nm). Otros miden también a una longitud de onda determinada pero esta longitud de onda se puede elegir en un rango amplio (190-800 nm). Puesto que en estos detectores se puede llevar a cabo la elección de la longitud de onda, se puede mejorar la sensibilidad respecto a cada compuesto, ya que se puede elegir la longitud de onda más adecuada.

El detector de fila (matriz) de diodos puede medir en todo el espectro de longitud de ondas al mismo tiempo y el usuario puede determinar absorciones concretas a longitudes de ondas diferentes.

A la hora de elegir las longitudes de onda para llevar a cabo medidas con el detector UV, se puede encontrar en bibliografía la longitud de onda correspondiente a la máxima absorción de cada cromóforo. Otra posibilidad es obtener de forma preliminar el espectro de absorción de los distintos analitos [84][85][87].

1.7. VALIDACIÓN ANALÍTICA

La validación de un procedimiento analítico es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas [89].

1.7.1. Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad para obtener una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado. En esta sección la “linealidad” se refiere a la linealidad de la relación entre la concentración y la medida de valoración.

La linealidad debe establecerse en el intervalo completo del procedimiento analítico. Debería establecerse inicialmente mediante examen visual de un gráfico de señales como función de concentración de analito del contenido. Si parece existir una relación lineal, los resultados de la prueba deberían establecerse mediante métodos estadísticos adecuados (por ejemplo mediante el cálculo de una línea de regresión por el método de los mínimos cuadrados). Los datos obtenidos a partir de la línea de regresión pueden ser útiles para

proporcionar estimaciones matemáticas del grado de linealidad. Se deberían presentar el coeficiente de correlación, la intersección con el eje de ordenadas, la pendiente de la línea de regresión y la suma de los cuadrados residuales.

La ICH recomienda que, para establecer la linealidad, se utilicen normalmente un mínimo de cinco concentraciones[89].

1.7.2. Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero. La exactitud de un procedimiento analítico debe establecerse en todo su intervalo.

En la valoración de un fármaco en un producto formulado, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del procedimiento analítico a mezclas sintéticas de los componentes del producto farmacéutico al que se hayan añadido cantidades conocidas de analito dentro del intervalo del procedimiento. Si no resulta posible obtener muestras de todos los componentes del producto farmacéutico, se puede aceptar tanto el agregado de cantidades conocidas de analito al producto farmacéutico, como la comparación de los resultados con los de un segundo procedimiento bien caracterizado, cuya exactitud haya sido comprobada o definida.

Los documentos de la ICH recomiendan que se evalúe la exactitud utilizando un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración.

La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra[89].

1.7.3. Precisión

La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión de un procedimiento analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa de una serie de mediciones. La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o repetibilidad del procedimiento analítico en condiciones normales de operación. En este contexto la reproducibilidad se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios. La repetibilidad se refiere a la utilización del procedimiento analítico en un laboratorio durante un periodo de tiempo corto realizado por el mismo analista con el mismo equipo.

La precisión de un procedimiento analítico se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea que permita calcular estadísticamente estimaciones válidas de la desviación estándar o de la desviación estándar relativa.

Los documentos ICH recomiendan que se evalúe la repetibilidad utilizando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado para el procedimiento (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración, o un mínimo de seis repeticiones al 100% de la concentración de prueba) [89].

1.7.4. Limite de detección

El límite de detección es una característica de las pruebas de límite. Es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede detectarse, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas. Las

pruebas d límite simplemente comprueban que la cantidad de analito se encuentra por encima o por debajo de un nivel determinado. El límite de detección se expresa habitualmente en forma de concentración analito en la muestra.

En el caso de procedimientos analíticos instrumentales que presentan ruido de fondo, los documentos de ICH describen un enfoque usual, que consiste en comparar las señales medidas a partir de muestras con bajas concentraciones de analito con las muestras blanco. Se establece la concentración mínima a la que puede detectarse confiablemente un analito. Las relaciones señal-ruido habitualmente aceptables son de 2:1 ó 3:1. Otros enfoques dependen de la determinación de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de la respuesta[89].

1.7.5. Limite de cuantificación

El límite de cuantificación es una característica de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración en la matriz de una muestra. Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas. El límite de cuantificación se expresa habitualmente en forma de concentración de analito en la muestra.

En el caso de procedimientos analíticos instrumentales, que presenten ruido de fondo, los documentos ICH describen un enfoque común, que consiste en comparar señales medidas a partir de muestras con bajas concentraciones conocidas de analito con las de muestras blanco. Se establece la concentración mínima a la que puede cuantificarse confiablemente un analito. Una relación señal-ruido habitualmente aceptable es de 10:1. Otros enfoques dependen de la determinación de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de las respuestas [89].



CAPITULO II:
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. AMBIENTE UTILIZADO

Laboratorio de Investigación Docente “Proyecto Mercurio” de la Universidad Católica De Santa María.

2.2. MATERIALES

2.2.1. Muestras

Las ocho muestras de vinos tinto borgoña fueron obtenidas, en supermercados Tottus, todos de marcas nacionales. En la **TABLA N° 2.** se asigna un código a cada muestra de vino, en la misma se menciona la marca, el año y el lote, para la identificación de cada vino.

TABLA N°2.- Identificación codificada de muestras de vinos analizados

MUESTRA	MARCA	AÑO	LOTE
M-01	Santiago Queirolo	2012	LT-A06-0-020712
M-02	Quenta	2011	LT:V550011111
M-03	Hacienda del abuelo	2012	VB1202
M-04	Reinoso	2010	01B6010
M-05	Tabernero	2012	0080512
M-06	Majes tradición	2012	L2F:07-12
M-07	Paz soldán	2012	01505
M-08	Viña vieja	2010	V02010

FUENTE: Elaboración propia

2.2.2. Equipos

- Cromatografo en fase liquida de alta resolución (HPLC) LaChrom (Merck Hitachi) dotado de un detector ultravioleta-visible de absorbancia modelo L-7400, una bomba L-7100, un inyector manual Rheodyne con un bucle de 20 microlitros. Para el almacenado y evaluación de datos se uso como base de datos se uso como software EZChrom Elite Client/Server y un ordenador personal.
- Purificador de agua: Easy pure II – RF Ultra pure water system, con una conductividad de 18 M Ω
- Balanza analítica Pioneer OHAUS, con una máxima capacidad: 210g y sensibilidad: 0,0001g
- Baño ultrasónico: BRANSONIC modelo 2510E-DTH
- Agitador Vortex Mini 230V, modelo N° 945301
- Potenciómetro Metrohm 827 pH Lab

2.2.3. Reactivos

Reactivos puros para análisis cromatográfico HPLC:

- Estandar trans-resveratrol con una pureza de 99% (Sigma)
- Metanol grado HPLC (Merck)
- Acetonitrilo grado HPLC (Merck)
- Etanol (Merck)
- Acido orto-fosfórico (Merck)
- Agua ultrapura

2.2.4. Materiales de laboratorio

- Equipo de filtración de fase móvil, compuesto de:
 - ✓ Matraz de 1000mL
 - ✓ Embudo de 250mL
 - ✓ Pinza de Aluminio
 - ✓ Cuerpo para placa porosa con Oliva de plástico
- Pipetas volumétricas de 5ml
- Pipetas volumétricas de 10mL
- Micropipeta de 250 uL
- Micropipeta de 100uL
- Botella de vidrio de 1000mL
- Fiolas de 5mL y 10mL
- Filtro de jeringa Anotop Whatman 0.45 um
- Filtro de membrana Whatman de 0.22um de tamaño de poro
- Cartuchos de Extracción en Fase Solida (SPE) LiChrolut RP-18 (40-63um)
- Dos pre-columns Chromolith Performance RP-18e 100-4.6 nm.

2.3. MÉTODO

Para hallar los niveles de *trans*-resveratrol, en vinos tinto borgoña peruanos fue necesario realizar:

- Optimización de condiciones cromatográficas
- Validación de técnica analítica
- Determinación cuantitativa de *trans*-resveratrol por HPLC.

Así también se estableció la forma de reuso de los cartuchos para SPE.

2.3.1. Optimización de condiciones cromatográficas

Inicialmente la pre-columna Chromolith Performance RP-18e 100-4.6 nm fue equilibrada con Metanol–Acido Acetico–Agua (10:2:88, v/v) por 10 minutos, a una longitud de onda de 280nm y a un flujo de 2,0 ml/min. Se utilizaron solventes A y B, los que estuvieron compuestos de la siguiente forma:

Solvente A: Metanol–Acido Acetico–Agua (10:2:88, v/v)

Solvente B: Metanol–Acido Acetico–Agua (90:2:8, v/v)

El *trans*-resveratrol fue eluido con una gradiente lineal de tres etapas detalladas a continuación:

- 100 a 85% de solvente A en 15 minutos
- 85 a 50% de solvente A en 10 minutos
- 50 a 30% de solvente A en 9 minutos

Con un tiempo de corrida de 35 minutos, no se observó la señal del estándar *trans*-resveratrol a una concentración de 4,5 mg/L. al inyectar al equipo la extracción del estándar de *trans*-resveatrol a una concentración de 50 mg/L, sí se observó como señal, el pico cromatográfico, el cual se hacía visible a los 12 minutos. Al inyectarse la extracción de una muestra de vino tinto borgoña, se visualizó el pico cromatográfico de *trans*-resveratrol a los 12 minutos, el cual no podía ser integrado, por encontrarse ligado a los primeros interferentes naturales en una muestra de vino, por lo que sería necesario separar dicho pico de tales interferentes.

Con la intención de lograr una optima integración y cuantificación del pico cromatográfico, se procedió a cambiar ciertos parámetros. La gradiente lineal continuo siendo la misma, el flujo se redujo a 1,0ml/min, pero sin obtener mejores resultados, se procedió a incorporar una pre-columna a la que ya se

estaba usando, es decir, se usaron dos pre-columnas a falta de una columna de mayor longitud, este procedimiento se estableció al ver que el pico de *trans-resveratrol* en la muestra de vino, precisaba ser separado de los primeros interferentes naturales en una muestra de vino. De igual manera no se consiguieron los resultados esperados y óptimos.

Se procedió a cambiar los parámetros inicialmente detallados, la cuantificación del compuesto *trans-resveratrol* fue realizado con una elución isocrática, las pre-columnas unidas, se equilibraron por un periodo de 15 minutos usando:

- Agua pH 3:Acetonitrilo (75:25)

Con una longitud de onda de 310 nm, un flujo de 1,5 ml/min y con un tiempo de corrida de 25 minutos se observó, gran mejoría del cromatograma, tanto del estándar a una concentración de 4,5 mg/L y sobretodo de la muestra de vino, en la que se había logrado separar el pico de *trans-resveratrol* de los primeros interferentes; aunque el tiempo de separación entre los primeros interferentes y el *trans-resveratrol* era muy corto, no permitía que el pico de *trans-resveratrol* estuviera en la línea base del cromatograma.

Con la intención de poder lograr que el pico de *trans-resveratrol* de la muestra de vino esté en la línea base del cromatograma, se disminuyó el flujo a 1,0 ml/min, con dicho cambio se consiguieron mejores resultados.

Posteriormente se realizaron modificaciones en la proporción de la fase móvil, llegando a un mejor resultado con la siguiente proporción:

- Agua pH 3:Acetonitrilo (70:30)

Con una longitud de onda de 310 nm, un flujo de 0,7 ml/min y con un tiempo de corrida de 20 minutos se observó el pico de *trans-resveratrol* en la muestra de vino perfilado, separado de los primeros interferentes de la muestra de vino y en la línea base como se muestra en la **FIGURA N° 5**.

Manteniéndose como fase estacionaria, las dos pre-columnas unidas, como se presenta en la **FIGURA N° 6**.

El pico de trans-resveratrol del estándar y la muestra de vino se evidenció a los 7,5 min. Definiéndose como tiempo de corrida para el estándar de trans-resveratrol 10 minutos y para la muestra 20 min.

Con el procedimiento anterior señalado, se definieron las condiciones cromatográficas para la cuantificación de trans-resveratrol como se muestra en la **TABLA N° 3 y 4**.

TABLA N° 3.- Proporción de fase móvil

PROPORCIÓN FASE MÓVIL (V/V)	
Acetonitrilo	Agua pH:3*
30	70

FUENTE: Elaboración propia

*El ajuste del agua a pH: 3, se realizo con acido orto-fosfórico,

TABLA N° 4.- Condiciones cromatográficas establecidas

PARÁMETROS	ESTÁNDAR	MUESTRA
Fase estacionaria:	Dos pre-columnas	Dos pre-columnas
Tiempo de estabilización	25min	25min
Flujo:	0,7ml/min	0,7ml/min
Longitud de onda:	310nm	310nm
Tiempo de corrida:	10min	20min

FUENTE: Elaboración propia

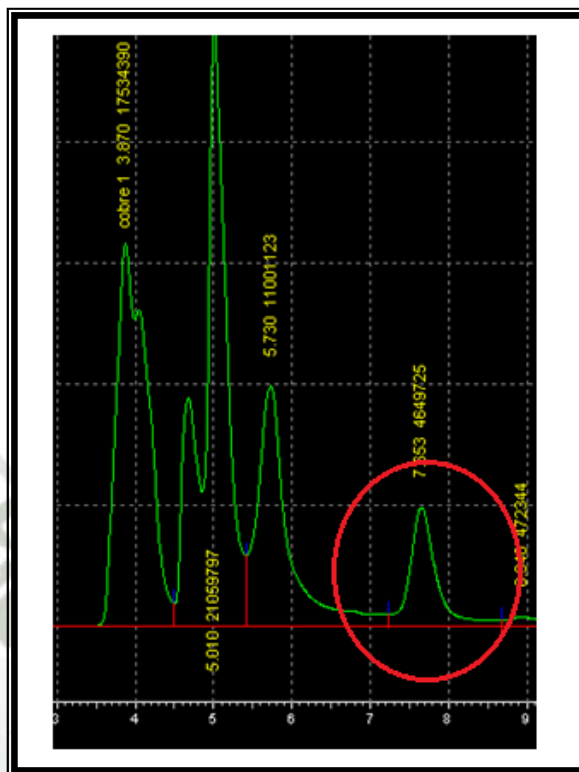


FIGURA N° 5.-Pico de *trans*- resveratrol, con condiciones cromatográficas definidas



FIGURA N°6.-Condiciones cromatográficas aplicadas

2.3.2. Validación de la técnica analítica

2.3.2.1. Linealidad

La linealidad del método se evaluó preparando como mínimo tres curvas de calibración con el estándar de *trans*-resveratrol con una pureza de 99%, en cinco niveles de concentración del analito, en el rango de trabajo de 0,5 mg/L a 4,5 mg/L, partiendo de una solución stock de 1000ppm como concentración.

Se prepararon tres curvas de calibración para evaluar los estimadores de regresión (coeficiente de regresión lineal, pendiente e intercepto de las tres curvas de calibración), en un intervalo de confianza de 95%.

Se realizaron tres extracciones cada una de 5 mL en cartuchos para SPE, de cada una de las disoluciones patrón, para después ser inyectadas al equipo para la obtención de las áreas correspondientes a cada disolución patrón.

2.3.2.2. Exactitud

Inicialmente se realizaron tres extracciones, cada una de 5 mL de la misma muestra de vino (M-06) mediante cartuchos para SPE, para posteriormente ser inyectada al equipo y obtener las áreas correspondientes a cada muestra. A ésta muestra se le llamo “muestra sin fortificar”.

Se realizaron tres extracciones, cada una de 5mL de la misma muestra de vino (M-06) mediante cartuchos para SPE. A los 5mL de vino se le añadió 1,63 mg/L y 2, 26 mg/L de la solución stock, que correspondía a 8uL y 11,1 ul respectivamente, dicha adición se realizó antes de operarse la extracción, posteriormente de igual forma las muestras fueron inyectadas al equipo para

obtener las áreas correspondientes de cada muestra. Las muestra que fueron enriquecidas con la solución stock, se les llamó “muestras fortificadas”.

2.3.2.1. Precisión

Se realizaron seis extracciones mediante cartuchos para SPE al cien por ciento de la concentración de una muestra de vino (M-06), para evaluar la repetibilidad del método. Se utilizó el mismo procedimiento analítico, el mismo analista y el mismo equipo.

2.3.2.3. Limite de detección

El límite de detección para el método utilizado, dependió de la determinación de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de las respuestas.

2.3.2.4. Limite de cuantificación

El límite de cuantificación para el método utilizado, dependió de la determinación de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de las respuestas.

2.3.3. Determinación cuantitativa de *trans*-resveratrol por HPLC

2.3.3.1. Elaboración de la curva de calibración

Para la cuantificación del *trans*-resveratrol, se construyó la curva de calibración con el estándar *trans*-resveratrol, en las concentraciones de 0,5; 1,5; 2,5; 3,5; y 4,5 mg/L, a partir de una solución stock de 1000 mg/L.

El intervalo de la curva de calibración se dio en función de la medida de *trans-resveratrol* realizada en vinos algunos vinos peruanos en un previo estudio [37].

La solución stock se preparó, pesando 10,30 mg de estándar de *trans-resveratrol* en una fiola de 10 mL, usando metanol como disolvente [83], obteniendo 1000 mg/L como concentración.

La preparación del estándar, debe ser lo más similar posible a la muestra, siendo así, se prepararon 25mL de disolución patrón para las concentraciones de 1,5; 2,5; 3,5; y 4,5 mg/L siguiéndose el siguiente procedimiento:

- Se tomo cierta cantidad en microlitros de solución stock, equivalente a la concentración requerida, como se muestra en la **TABLA N°5**

TABLA N°5.- concentración de disoluciones patrón en mg/L equivalente a ul.

Solución stock (uL)	Concentración mg/L
12,3	0,5
36,8	1,5
61,3	2,5
85,9	3,5
110,3	4,5

FUENTE: Elaboración propia

- Se añadió 11% de etanol.
- Se enrasó con agua a un volumen de 25 mL.

Después de haberse preparado las disoluciones patrón para los cinco niveles de concentración, se realizó la extracción mediante cartuchos para SPE, dicho procedimiento, como se muestra en la **FIGURA N° 7** de extracción es detallado a continuación:

- Acondicionamiento del Cartucho para SPE, con 4 mL de Metanol y 4 mL de agua ultra pura.
- Se tomó una alícuota de 5 mL de la disolución patrón preparada anteriormente, tomando la precaución de forrar el cartucho con papel aluminio, para proteger la disolución patrón de la luz.. (Se usó un cartucho de SPE para cada solución de estándar).
- El cartucho es secado con aire comprimido
- Se añadió 5 mL de Metanol y se recepciono dicho volumen en una fiola de 5 mL.
- Posteriormente la fiola de 5 mL que contiene la extracción del estándar es agitada en un agitador Vortex.
- El volumen de 5 mL fue filtrado por un filtro de jeringa anotop de 0,45 um, para después realizar las inyecciones por triplicado al equipo HPLC y obtenerse las respectivas áreas.

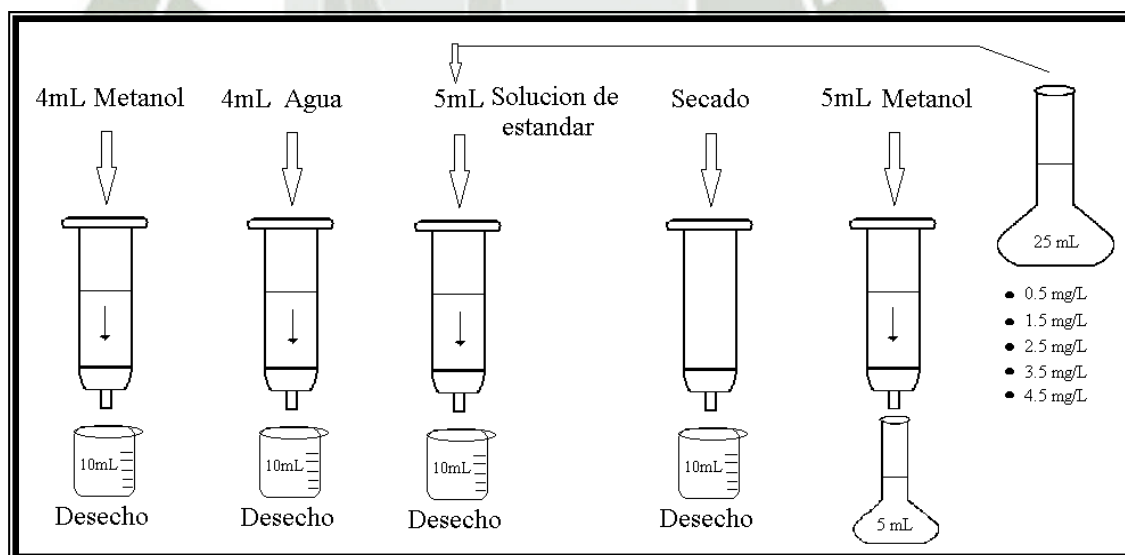


FIGURA N° 7. Procedimiento de SPE para curva de calibración.

Se hizo también el cálculo respectivo para hallar la concentración verdadera de cada nivel de concentración que conforma la curva de calibración. En la **TABLA N° 6.** se presenta, las concentraciones finales de cada nivel de la curva de calibración, llegándose al mismo mediante la concentración de la solución stock, que fue hallada, por el peso del estándar, la pureza del mismo y la dilución en la que se llevo a cabo.

TABLA N° 6. Concentraciones para Curva de Calibración.

	CONCENTRACION
SOLUCION STOCK	$\frac{10,30\text{mg}}{0,01\text{L}} = \frac{1030\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{99\%}{100\%} = 1019,70 \text{ mg/L}$
DILUCIONES PARA CURVA DE CALIBRACION	$\frac{1019,70\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{0,0000123\text{L}}{0.025\text{L}} = 0,5017 \text{ mg/L}$
	$\frac{1019,70\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{0,0000368\text{L}}{0.025\text{L}} = 1,5001 \text{ mg/L}$
	$\frac{1019,70\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{0,0000613\text{L}}{0.025\text{L}} = 2,5003 \text{ mg/L}$
	$\frac{1019,70\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{0,0000859\text{L}}{0.025\text{L}} = 3,5036 \text{ mg/L}$
	$\frac{1019,70\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{0,0001103\text{L}}{0.025\text{L}} = 4,5001 \text{ mg/L}$

FUENTE: Elaboración propia

Conservación de las muestras estándar:

La solución stock inicialmente preparada se protegió de la luz al forrar la fiola con papel aluminio y se refrigeró, hasta ser utilizada, de la misma forma se protegieron las disoluciones patrón. Los cartuchos para SPE también fueron forrados con papel aluminio, para proteger a la solución estándar de la luz.

2.3.3.2. Extracción en Fase Sólida de *trans*-resveratrol en muestras de vinos

La determinación cuantitativa de *trans*-resveratrol en las muestras de vinos tinto borgoña de marcas peruanas, fue realizada igual al procedimiento realizado para las soluciones de estándar. La cuantificación se realizó mediante extracciones por cartuchos para SPE.

Se tomó una muestra homogénea de la botella de vino, a un tubo de ensayo, cubierto de papel aluminio y tapado con parafilm, las muestras se refrigeraron hasta su respectivo análisis.

El procedimiento de la extracción del *trans*-resveratrol mediante los cartuchos para SPE, como se muestra en la **FIGURA N° 8** se detalla a continuación:

- Acondicionamiento del Cartucho para SPE, con 4 mL de Metanol y 4 mL de agua ultra pura.
- Se tomó una alícuota de 5 mL de muestra de vino, tomando la precaución de forrar el cartucho con papel aluminio, para proteger la muestra de la luz. (Se usó un cartucho de SPE para cada muestra de vino).
- El cartucho es secado con aire comprimido
- Se añadió 5 mL de Metanol y se recibió dicho volumen en una fiola de 5 mL.
- Posteriormente la fiola de 5 mL que contiene la muestra, es agitada en el agitador Vortex.

- El volumen de 5 mL fue filtrado por un filtro de jeringa Anotop de 0,45 μm , para después realizar las inyecciones por triplicado al equipo HPLC y obtenerse las respectivas áreas.

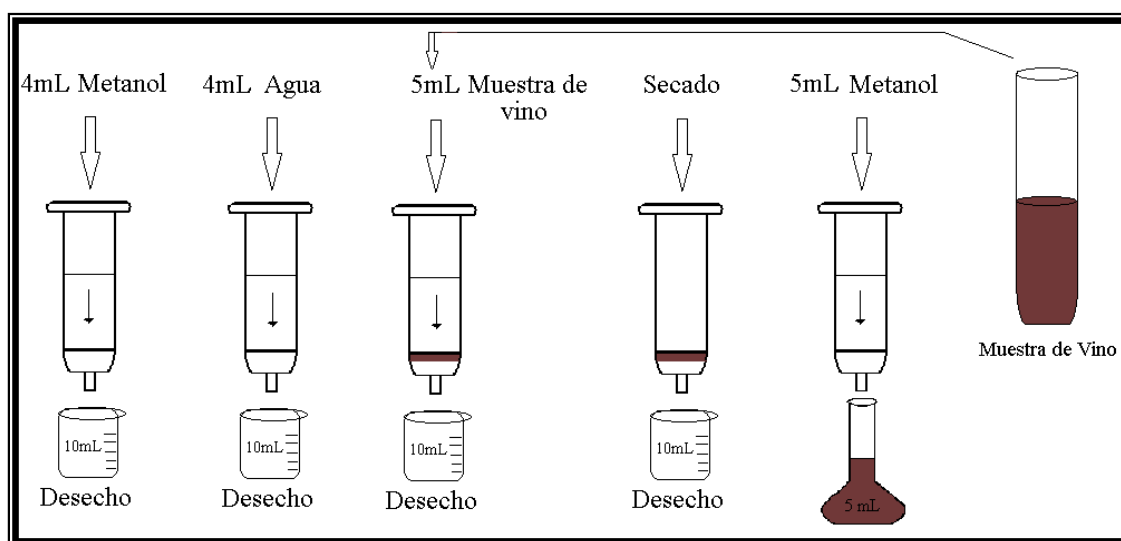


FIGURA N° 8. Procedimiento de SPE para muestras de vinos.

2.3.4. Uso de Cartuchos para Extracción en Fase Sólida (SPE)

En la presente investigación también se verificó que los cartuchos para SPE son reusables. Para evaluar la linealidad del método analítico y validación del mismo se elaboraron tres curvas de calibración, las extracciones para la elaboración de la primera curva de calibración se realizaron mediante cartuchos para SPE nuevos, mientras que las extracciones para la elaboración de la segunda y tercera curva de calibración, se realizaron con los cartuchos iniciales, aquellos que fueron utilizados para la elaboración de la primera curva de calibración.

Así también se realizaron las extracciones de las ocho muestras de vinos tinto borgoña mediante cartuchos para SPE nuevos, posteriormente se realizaron segundas extracciones de las ocho muestras de vinos tinto borgoña en los mismos cartuchos para SPE.

Para que los cartuchos de SPE pudieran ser reusados, éstos fueron sometidos a un procedimiento adecuado de lavado:

A. Procedimiento de lavado del cartucho de SPE para estándar *trans-resveratrol*

Se lavó el cartucho con 5 mL de metanol, 5 mL de agua, 4 mL de metanol y 4 mL de agua para después añadirse la disolución patrón de *trans-resveratrol*, como se muestra en la **FIGURA N° 9**.

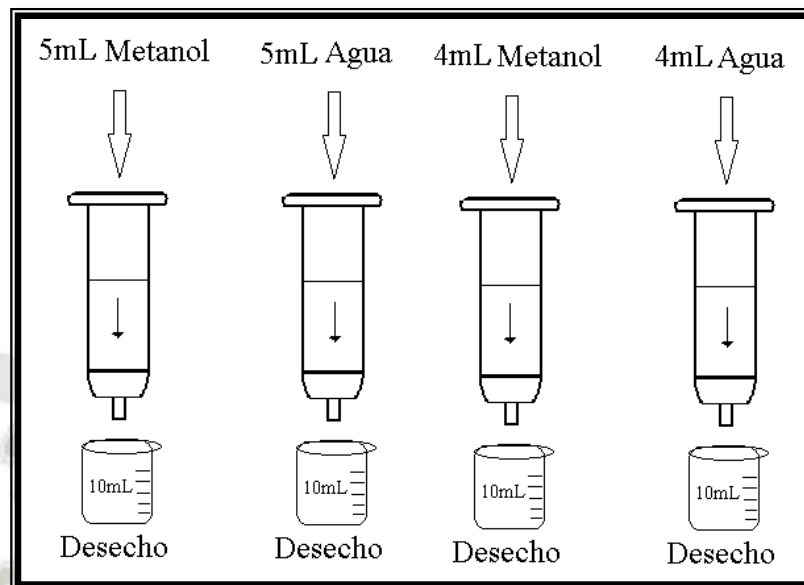


FIGURA N° 9. Procedimiento de lavado del cartucho de SPE para estándar *trans-resveratrol*

B. Procedimiento de lavado del cartucho de SPE para muestras de vinos tinto borgoña.

Se lavó el cartucho con 5 mL de metanol, 5 mL de agua, 5 mL metanol, 4 mL de metanol, 4 mL de agua para después añadirse la muestra de vino borgoña, como se muestra en la **FIGURA N° 10**.

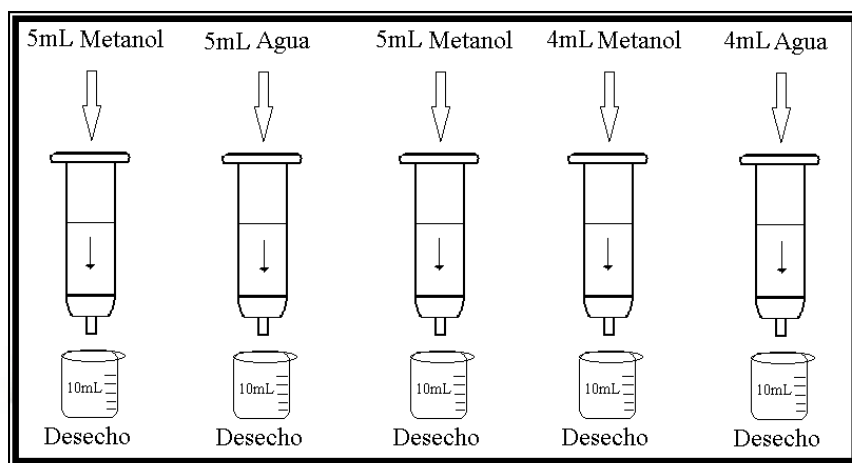
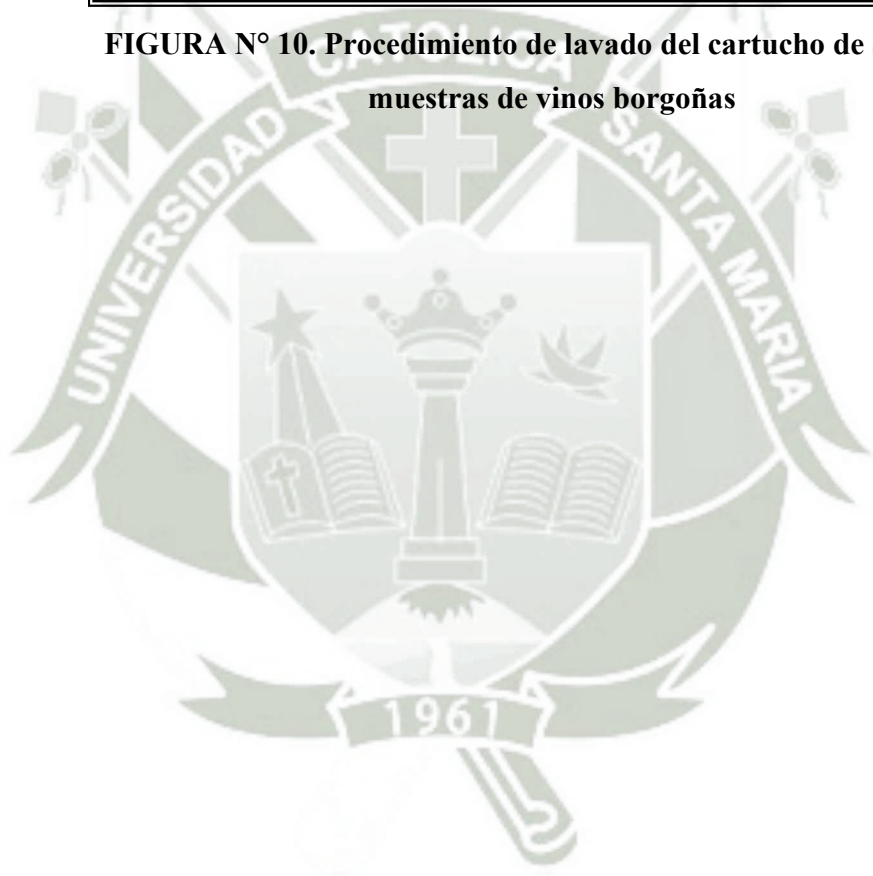


FIGURA N° 10. Procedimiento de lavado del cartucho de SPE para muestras de vinos borgoñas





CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA

3.1.1. Linealidad

La linealidad del procedimiento analítico en la presente investigación refiere la relación que existe entre la concentración y la medida de valoración, se realiza con el objetivo de obtener un modelo que describa con precisión la relación de la concentración versus respuesta.

Para la evaluación experimental de la linealidad del método, fue necesario elaborar tres curvas de calibración, mediante extracciones en cartuchos para SPE, cada una de ellas en cinco niveles de concentración siendo el rango de trabajo de 0,5 mg/L a 4,5 mg/L.

Después de haberse preparado las diluciones patrón y realizado las respectivas extracciones como se menciona en la metodología (2.3.3.1), se hicieron inyecciones por triplicado de cada nivel de concentración de las tres curvas de calibración, obteniéndose las áreas correspondientes, tal y como se puede observar en la **TABLA N° 7**.

Cabe mencionar también que con un tiempo de corrida de diez minutos el pico de trans- resveratrol se hizo visible a los cinco minutos en todas las diluciones patrón inyectadas, dicho pico y tiempo puede evidenciarse en el respectivo cromatograma de la **FIGURA N° 11**

TABLA N° 7.-Áreas obtenidas por triplicado de los cinco niveles de concentración para las tres curvas de calibración

		CURVA - 1	CURVA - 2	CURVA - 2
	Concentración Trans-resveratrol mg/L	Área	Área	Área
1	0,50	766024	766024	685795
2	0,50	760603	788439	632181
3	0,50	764346	731692	666681
4	1,50	2256183	2145831	2146573
5	1,50	2240919	2251972	2146350
6	1,50	2235023	2176036	2152917
7	2,50	3570071	3561560	3666520
8	2,50	3534628	3575623	3598795
9	2,50	3517020	3580275	3670203
10	3,50	4846827	4798707	4799212
11	3,50	4862546	4804384	4774704
12	3,50	4855301	4785057	4787379
13	4,50	6233560	6117036	6287972
14	4,50	6271098	6140671	6159254
15	4,50	6249658	6177869	6182399

FUENTE: Elaboración propia

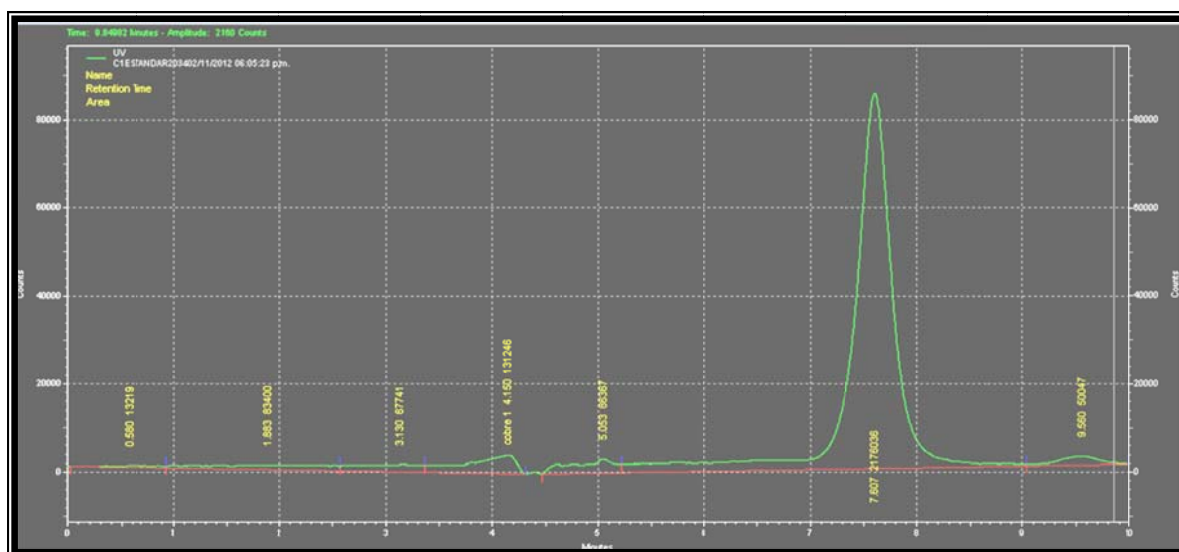


FIGURA N°11,- Cromatograma de una disolución patrón de 1,5 mg/L

La evaluación estadística de la linealidad del método se realizó por medio:

A. Cálculo de la recta de regresión

El cálculo de la recta de regresión se determinó, sobre los puntos promediados. Para el caso de la curva de calibración, la función toma la forma:

➤ $Y=a+bx$ donde:

- ❖ x: Concentración o cantidad del analito (variable independiente)
- ❖ y: Respuesta (variable dependiente)
- ❖ b: Valor de la pendiente (indica la sensibilidad del método)
- ❖ a: Ordenada de origen (termino independiente o intercepto. Para probar que la recta pasa por el origen y que cualquier desviación se debe a un error aleatorio

Para hallarse los valores que corresponden al intercepto “a” y pendiente “b”. fue necesario establecerse la recta de regresión como se muestra en la **TABLA N° 8**.

Después de haberse establecido la recta de regresión, los valores que corresponden al intercepto “a” y pendiente “b” fueron hallados mediante las siguientes formulas:

$$a = \frac{\Sigma y - b \Sigma x}{n} \qquad b = \frac{\Sigma xy - \frac{\Sigma x \Sigma y}{n}}{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}}$$

Correspondiendo a valores del intercepto “a” y pendiente “b” los siguientes:

a: 111932,61

b: 1356474,66

Siendo la ecuación de la recta: $y = 111932,61 + 1356474,66(x)$

La recta de regresión lineal, pudo graficarse a su vez, en la **FIGURA N° 12** en la que se evidencia la linealidad del método, que fue construida con la concentración versus la respuesta, en la que la respuesta (y) es dependiente de la concentración (x).

TABLA N° 8.- Resultados de la linealidad del método para patrones de trans-resveratrol

	X	Y	X*Y	X²	Y²	F=(Y/X)
1	0,50	729087,22	365775,77	0,25	5.32E+11	1453262,42
2	1,50	2194644,89	3294140,03	2,25	4.82E+12	1462131,59
3	2,50	3586077,22	8966268,88	6,25	1.29E+13	1434258,78
4	3,50	4812679,67	16861704,48	12,28	2.32E+13	1373638,45
5	4,50	6202168,56	27910378,72	20,25	3.85E+13	1378229,05
Σ	12,51	17524657,56	57398267,88	41,28	79836764575143.80	7101520,28
\bar{x}	2,50	3504931,51				1420304,06
D.S						41768,75
C.V%						2.94

FUENTE: Elaboración propia

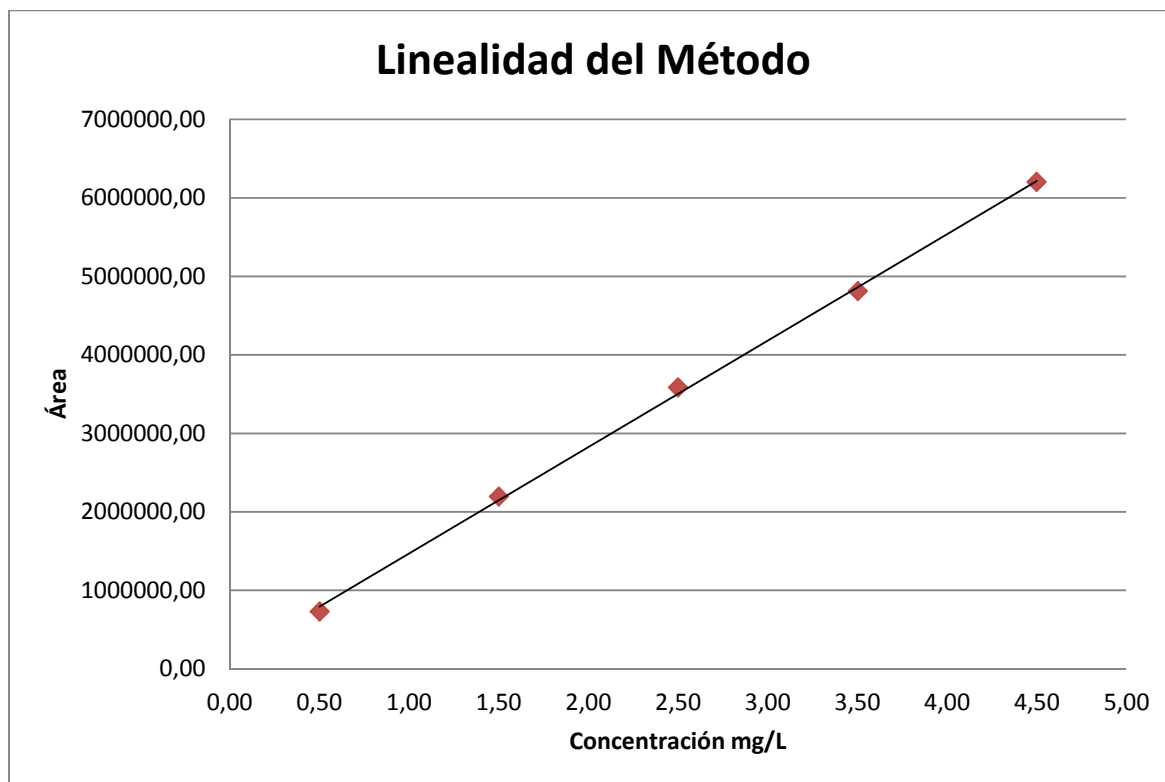


FIGURA N° 12.- Linealidad del método

B. Interpretación estadística de la regresión lineal

Se realizó la interpretación estadística de la regresión lineal a través del cálculo de:

➤ Coeficiente de correlación “r”

Con la finalidad de poder conocer el grado de intensidad de la relación existente entre las variables “x” e “y”, se halla el valor del coeficiente de correlación lineal, el que puede adoptar distintos valores por consiguiente distintos indicadores como:

r = 1 indica una recta perfectamente lineal

r = -1 indica una recta perfectamente lineal negativa

r = 0 indica que no hay correlación entre x e y

El coeficiente de correlación lineal se determinó con los valores hallados en la **TABLA N° 8** antes ya mencionada y con la siguiente fórmula:

$$r = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left(\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n}\right) \left(\frac{\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}}{n}\right)}}$$

Después de aplicarse la fórmula para hallarse el coeficiente de correlación, se obtuvo como resultado: 0,9996. Dicho valor indica que la recta de regresión es casi perfectamente lineal y que existe una correlación lineal positiva.

Posteriormente se halló el coeficiente de determinación “r²”, hallándose como valor: 0,9991. El valor es muy cercano a uno, estableciendo que el modelo lineal es adecuado para describir la relación que existe entre las

variables “x” e “y”. Pudiendo afirmar que el 99,91% de las variaciones se debe a influencia de la variable “x”.

Uno de los mejores indicativos del modelo lineal no es únicamente el coeficiente de correlación “r” sino un test estadístico, basado en dos hipótesis, en el que se calcula el t experimental y el t tabla, con un nivel de confianza de 95%, como se detalla a continuación:

HIPÓTESIS NULA (Ho): no hay correlación entre “x” e “y” ($r = 0$)

HIPÓTESIS ALTERNA (H1): “r” no debe ser significativamente diferente de uno ($r \neq 0$)

Se encontró como valor de $t_{\text{regresión}}$: 170,96, hallado mediante la siguiente fórmula:

$$t_{\text{regresión}} = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

El valor de t_{tabla} fue de: 2,16 para 13 ($15 - 2 = 13$) grados de libertad y un nivel de confianza de 95%, valor que es encontrado en la tabla de distribución Student.

El valor de $t_{\text{regresión}}$ debe ser mayor al de t_{tabla} para poder rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alternativa, determinándose así que el valor del coeficiente de correlación no es significativamente diferente de uno, lo que señala que $r \neq 0$, a su vez afirmando que si existe una correlación significativa entre las variables “x” e “y”.

➤ Limite de confianza del intercepto “a” y pendiente “b”

Para hallar los limites de confianza del intercepto y pendiente de la recta de regresión, fue necesario ajustar los datos por el método de los mínimos cuadrados, que es detallado en la **TABLA N° 9**.

TABLA N° 9. Ajuste por el método de los mínimos cuadrados

	X_1	Y_1	X^2	\hat{Y}_1	$Y_1 - \hat{Y}_1$	$(Y_1 - \hat{Y}_1)^2$	$X_1 - X$	$(X_1 - X)^2$
1	0.50	729087.22	0.25	792462.38	-63375.16	4016410710	-2.00	3.99
2	1.50	2194644.89	2.25	2147987.51	46657.38	2176911038	-1.00	1.00
3	2.50	3586077.22	6.25	3503526.20	82551.02	6814670715	0.00	1.07E-06
4	3.50	4812679.67	12.27	4864477.23	-51797.56	2682987668	1.00	1.00
5	4.50	6202168.56	20.25	6216204.23	-14035.68	197000182.10	2.00	3.99
Σ	12.51	17524657.56	41.28	17524657.56	0.00	15887980312.42	0.00	10.00
\bar{x}	2.50	3504931.51		3504931.51				2.00

FUENTE: Elaboración propia

Para poder hallar los intervalos de confianza, es necesario conocer el error típico estándar, desviación estándar en la pendiente y desviación estándar en intercepto, valores que son encontrados por medio de las siguientes formulas:

- ❖ Error típico estándar:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(\gamma - \hat{y})^2}{n - 2}}$$

- ❖ La desviación estándar en la pendiente:

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum(x_1 - \bar{x})^2}}$$

- ❖ Desviación estándar en intercepto:

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_1^2}{n \sum(x_1 - \bar{x})^2}}$$

Aplicadas las formulas ya citadas se encontraron los siguientes valores:

$$S_{y/x} : 72773,58$$

$$S_b : 23014,33$$

$$S_a : 66129,48$$

Limites de confianza del intercepto “a” Para hallar los limites de confianza del intercepto, es necesario encontrar el valor de t_{tabla} .

El valor de t_{tabla} fue de: 3,182 para 3 ($5 - 2 = 3$) grados de libertad con un nivel de confianza de 95%. que es obtenido en la tabla de distribución de Student.

Para conocer el valor del límite de confianza del intercepto se multiplico el valor de t_{tabla} con la desviación estándar del intercepto (S_a), con lo que se obtuvo como límite de confianza: 210424,01, por consiguiente el intervalo de confianza del intercepto "a" es de - 98491,40 hasta 322356,62

Posteriormente se realizo un test estadístico del intercepto "a", basado en dos hipótesis, en el que se calcula el $t_{\text{experimental}}$ y el t_{tabla} , con un nivel de confianza de 95%, como se detalla a continuación:

HIPOTESIS NULA (H_0): No existe diferencia significativa entre el intercepto y cero" (intercepto = 0)

HIPOTESIS ALTERNA (H_1): Existe diferencia significativa entre el intercepto y cero (intercepto $\neq 0$)

Se hizo una comparación del valor de t_{tabla} y el valor de $t_{\text{experimental}}$, hallándose el valor de t_{tabla} en la tabla de distribución Student, y el valor de $t_{\text{experimental}}$ fue hallado mediante la siguiente fórmula:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|a|}{S_a}$$

Se halló como valor para t_{tabla} : 3,182 para 3 ($5-2 = 3$) grados de libertad y un nivel de confianza de 95% y como valor para $t_{\text{experimental}}$: 1,69. Al cumplirse que $t_{\text{experimental}}$ es menor que t_{tabla} , según las condiciones mencionadas, se puede decir que el valor de "a" es aceptable, ya que la ordenada en el origen es estadísticamente igual a cero.

Limites de confianza de la pendiente “b” Para hallar los limites de confianza de la pendiente, es necesario encontrar el valor de t_{tabla} .

El valor de t_{tabla} fue de: 3,182 para 3 ($5 - 2 = 3$) grados de libertad con un nivel de confianza de 95%. que es obtenido en la tabla de distribución de Student.

Para conocer el valor del límite de confianza de la pendiente se multiplico el valor de t_{tabla} con la desviación estándar de la pendiente (S_b), con lo que se obtuvo como límite de confianza: 73231,59 por consiguiente el intervalo de confianza de la pendiente “a” es de 1283243,07 hasta 1429706,25.

Posteriormente se realizo un test estadístico de la pendiente “b”, basado en dos hipótesis, en el que se calcula el $t_{\text{experimental}}$ y el t_{tabla} , con un nivel de confianza de 95%, como se detalla a continuación:

HIPÓTESIS NULA (H_0): "b" es igual a cero ($b=0$)

HIPÓTESIS ALTERNA (H_1): "b" es significativamente diferente de cero ($b \neq 0$)

Se encontró como valor de $t_{\text{experimental}}$: 58,94, hallado mediante la siguiente fórmula:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|b|}{S_b}$$

Se halló como valor para t_{tabla} : 3,182 para 3 ($5-2 = 3$) grados de libertad y un nivel de confianza de 95% valor que es encontrado en la tabla de distribución Student La Hipótesis nula se rechaza, ya que el valor de: $t_{\text{experimental}}$ es mayor que t_{tabla} . por lo que se afirma que si

existe una correlación lineal significativa, entonces la pendiente "b" es significativamente diferente de cero ($b \neq 0$)

➤ Coeficiente de variación de los valores de respuesta

Para hallar el coeficiente de variación se calculó primero la media aritmética y la varianza de "f" como se muestra en la **TABLA N° 8** ya antes señalada. El coeficiente de variación es la relación que hay entre la varianza y la media aritmética multiplicada por cien. El coeficiente de variación permite comparar la dispersión entre dos variables, éste elimina la dimensionalidad de las variables y tiene en cuenta la proporción existente entre una medida de tendencia y la desviación típica o estándar.

El valor encontrado para el coeficiente de variación fue de 2.94%, es decir que el conjunto de datos en relación a su media, se encuentran con un grado de 2,94% de dispersión.

C. Análisis de varianza ANOVA

Para demostrar la regresión y la linealidad, se realizó un análisis de varianza ANOVA, utilizando el estadístico F de Fisher, con un nivel de confianza de 95%.

Para realizar el análisis de varianza, se realizan una serie de cálculos, expresados en la **TABLA N° 10**. Con el objetivo de llegar al valor de "f", obteniéndose como valor para el estadístico F: 0,00000526.

TABLA N° 10.- Análisis de Varianza ANOVA.

ORIGEN DE VARIANZA	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA CUADRADOS -SC	CUADRADOS MEDIOS -CM	ESTADISTICO F
ENTRE GRUPOS	K-1= 3-1 2	SCE 203497639,30	CME 101748819,65	F=CME/CMD 5,26E-06
DENTRO GRUPOS	N-K=15-3 12	SCD 2.32E+14	CMD 1.93E+13	
TOTAL	N-1=15-1 14	SCT 2.32E+14		

FUENTE: Elaboración propia

El análisis estadístico, estuvo basado en dos hipótesis detalladas a continuación:

HIPOTESIS NULA: $H_0: \bar{x}_1 = \bar{x}_2 = \bar{x}_3$

HIPOTESIS ALTERNATIVA: $H_1: \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2 \neq \bar{x}_3$

Se obtuvo como valor para F_{tabla} : 3,89 para 2,12 grados de libertad con un nivel de confianza de 95%.

Dado que el valor de f experimental es menor al valor f tabla, se tiene evidencia experimental para rechazar la hipótesis alternativa y aceptar la hipótesis nula, es decir las áreas obtenidas en los cinco niveles de concentración, en las tres curvas de calibración, son significativamente iguales.

La evaluación estadística para la linealidad demostró que la pendiente para el método validado, fue significativamente diferente de cero, los interceptos convergen al origen y no son significativamente diferentes de cero.

La evaluación de los coeficientes de determinación y correlación, demostraron correlación entre la concentración (mg/L) y la respuesta (área) y que los cambios en la respuesta (variable dependiente) son debidos a la variación en la concentración (variable independiente). Bajo la evidencia muestral y un nivel de confianza de 95%, el valor del estadígrafo $t_{\text{experimental}}$ fue mayor que el valor de t_{tablas} .

Se realizó el análisis de varianza ANOVA, para evaluar la linealidad, bajo la evidencia muestral y un nivel de confianza de 95%, el valor del estadígrafo F de Fisher experimental fue menor que el valor de F de tablas, indicando que no se presentó desvío de la linealidad.

Para los descriptores de la curva de calibración como es intercepto y pendiente, se determinaron los intervalos de confianza, estimados con nivel de confianza de 95%.

El coeficiente de correlación fue de 0,9996, indicando una correlación lineal positiva y un coeficiente de variación que indica un 2,94% de dispersión del conjunto de datos respecto a su media.

3.1.2. Exactitud

El vino tinto borgoña Majes Tradición fue la muestra que se utilizó para realizar la evaluación de la exactitud del método.

La exactitud del método se evaluó estimando la recuperación expresada en porcentaje, al cuantificar el trans-resveratrol en muestras de vino tinto borgoña que fueron enriquecidas con 1,63 mg/L y 2,26 mg/L de solución stock y en muestras de vino tinto borgoña sin ningún enriquecimiento.

Las muestras de vinos tinto borgoña enriquecidos con solución stock, fueron llamadas “muestras fortificadas” y las que no fueron enriquecidas se les llamó “muestras sin fortificar”.

Mediante cartuchos para SPE se realizaron tres extracciones de las muestras fortificadas y tres extracciones de las muestras sin fortificar. Se obtuvieron como respuestas las áreas que se encuentran detalladas en la **TABLA N° 10**, así como también las respectivas concentraciones en mg/L que corresponden a cada muestra

El cálculo del porcentaje de recuperación se determinó usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ RECUPERACIÓN} = \frac{CC. \text{ muestra fortificada} - CC. \text{ muestra sin fortificar}}{CC. \text{ añadida conocida}}$$

Los valores encontrados como resultado de la aplicación de la fórmula ya descrita, se detallan también en la **TABLA N° 11**.

TABLA N° 11. Áreas y concentraciones de muestras para porcentaje de recuperación

	M. SIN FORTIFICAR ppm		M. FORTIFICADA 1.63ppm		M. FORTIFICADA 2.26 ppm		% RECUPERACIÓN	
	AREA	PPM	AREA	PPM	AREA	PPM	1,63 ppm	2,26 ppm
1	2461550	1,68	4884295	3,33	5793609	3,95	101,13%	100,41%
2	2448070	1,67	4887728	3,33	5813082	3,96	101,83%	101,40%
3	2446700	1,67	4833982	3,29	5789139	3,94	99,65%	100,72%
PROMEDIO		1,67		3,32		3,95		100,86%
DESVEST		0,01		0,02		0,01		0,01
C.V %		0,33		0,62		0,22		0,77

FUENTE: Elaboración propia

Se evidencia una gran diferencia de las concentraciones obtenidas de las muestras fortificadas y sin fortificar, mediante el grafico de barras comparativo, tal y como puede observarse en la **FIGURA N° 10**.

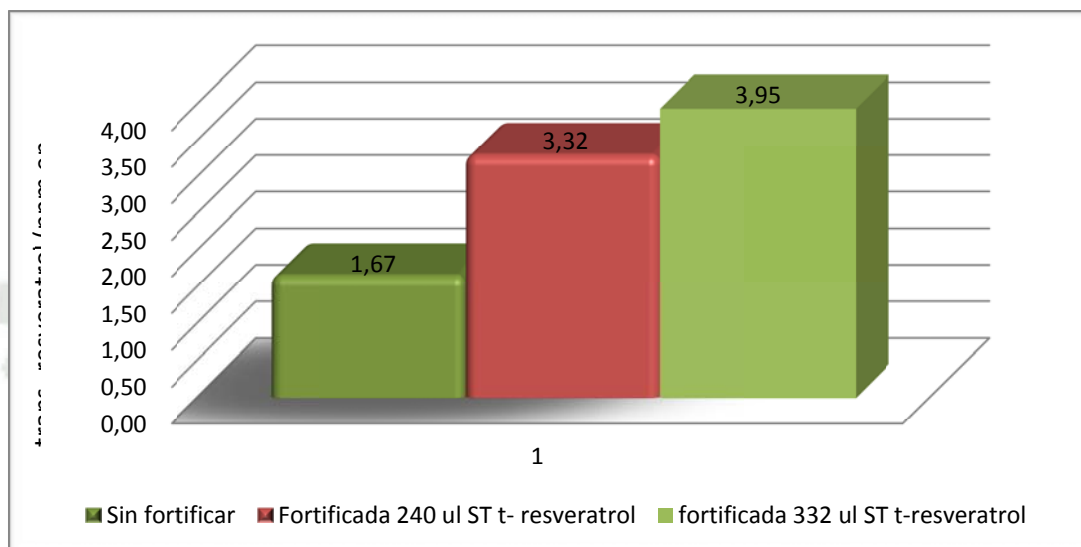


FIGURA N° 13. Muestra de vino fortificada y sin fortificar.

Los datos y resultados obtenidos en la determinación de la exactitud del método, fueron evaluados por medio de la prueba estadística t de student para comprobar que el valor medio no difiere significativamente del aceptado como referencia.

Debiéndose conocer el valor de $t_{\text{experimental}}$, se aplico la siguiente fórmula:

$$t_{exp} = \frac{|100 - R|\sqrt{n}}{C.V}$$

Obteniéndose como resultado un valor de $-21,0363613$ y encontrándose como valor para t tabla: $4,303$ para $3-1=2$ grados de libertad, con un nivel de confianza de 95%.

Siendo $t_{\text{experimental}}$ menor que t_{tabla} . no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100% siendo la exactitud apropiada.

La media del porcentaje de recuperación de la metodología fue de 100,86% se determinó un coeficiente de variación de 0,77%, indicando el grado de dispersión del conjunto de datos respecto a su media.

La evaluación de la exactitud mostró porcentajes de recuperación dentro de las especificaciones para el nivel estudiado, ésta se evaluó estadísticamente y se encontró que el valor de $t_{\text{experimental}}$ fue menor que el t_{tablas} , indicando que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100%.

3.1.3. Precisión

Se evaluó la precisión de la metodología, realizándose como mínimo seis extracciones de una misma muestra de vino mediante cartuchos para SPE, evaluándose así la repetibilidad de la metodología

Después de haberse realizado las seis extracciones mediante los cartuchos para SPE, las muestras fueron inyectadas al equipo obteniéndose como respuestas las áreas para cada una de las respectivas muestras, las cuales se detallan en la **TABLA N° 12**. así como también se detallan las respectivas concentraciones halladas para cada muestra repetida.

TABLA N° 12.-Repetibilidad para muestra de vino

REPETIBILIDAD		
	AREA	Trans-resveratrol mg/L
1	2988930	2,04
2	2993049	2,04
3	3056076	2,08
4	3016919	2,05
5	2960194	2,02
6	3185816	2,17
\bar{x}	3033497.33	2,07
D.S	81217.37	0,06
C.V%	2.68	2,68

FUENTE: Elaboración propia

La precisión de la metodología analítica se expresa como la desviación estándar relativa o coeficiente de variación, de las mediciones realizadas, se obtuvo un valor de 2,68% como coeficiente de variación, el cual indica que el conjunto de datos en relación a su media, se encuentran con un grado de 2,68% de dispersión.

También se realizó el cálculo del intervalo de confianza individual para la media de las repeticiones analizadas. Fue necesario hallar el valor de t tabla: 2,571 para $6-1=5$ grados de libertad con un nivel de confianza de 95%. El límite de repetibilidad se halló multiplicando la desviación estándar de las mediciones realizadas con el valor de t tabla hallado, encontrándose como valor para el límite de repetibilidad 0,14 mg/L.

El intervalo de confianza de repetibilidad, se halló mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Intervalo de confianza} = \bar{x} + (t_{\text{tabla}} * SD)$$

$$\text{intervalo de confianza} = \bar{x} - (t_{\text{tabla}} * SD)$$

Estableciéndose el intervalo de confianza de repetibilidad de 1,92 mg/L hasta 2,21 mg/L con respecto a la media de las mediciones realizadas.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos para la evaluación de la repetibilidad de la metodología analítica, demostró que el método es preciso. Se evaluó el límite de repetibilidad, el cual nos permitió determinar la máxima variabilidad en la respuesta de las muestras consideradas idénticas.

3.1.4. Límite de detección y cuantificación

El límite de detección y cuantificación se realizó por el método del cálculo a partir de la curva de la calibración en rango menor al lineal, evaluando estadísticamente la respuesta.

El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) se determinó mediante las siguientes formulas:

$$\text{LOD} = \frac{Y_{bl} + 3 S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}}$$

$$\text{LOQ} = \frac{Y_{bl} + 10 S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Donde:

Y_{bl} : intercepto de la curva

b: pendiente

S_{bl} : desviación estándar de la regresión

Se estimó el límite de detección, teniendo en cuenta la pendiente y tres veces la desviación estándar de la respuesta cromatográfica, obteniéndose 0,08 mg/L como valor del límite de detección. De la misma manera se estimó el límite de cuantificación, teniendo en cuenta la pendiente y diez veces la desviación estándar de la respuesta, obteniéndose 0,17 mg/L como límite de cuantificación.



3.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TRANS-RESVERATROL POR HPLC

La determinación de la concentración de trans-resveratrol se realizó haciendo extracciones por medio de cartuchos para SPE de las ocho muestras de vinos tinto borgoña. Después de haberse realizado las extracciones, se hicieron las inyecciones por triplicado para cada muestra de vino.

Se identificó el pico de trans-resveratrol presente en las muestras, por comparación del tiempo de retención de las diluciones patrón, con el tiempo de retención de la muestra. El tiempo de retención del pico de trans-resveratrol presente en las muestras de vinos tinto borgoña fue de cinco minutos, siendo el mismo para todas las diluciones patrón del estándar, como ya se había detallado anteriormente. El cromatograma de una muestra de vino tinto borgoña se evidencia en la **FIGURA N° 15**.

Tras las inyecciones realizadas de cada muestra, se obtuvo como respuesta las áreas respectivas de cada muestra, las que son detalladas en la **TABLA N° 15**.

Se realizaron dos extracciones para cada muestra de vino tinto borgoña, realizándose inyecciones por triplicado de cada extracción. Habiéndose realizado dos extracciones en el mismo cartucho para la determinación de trans-resveratrol en vinos tinto borgoña, las respuestas (áreas) obtenidas fueron muy similares, así como las respectivas concentraciones en mg/L calculadas por la función $y=a+bx$ establecida en la recta de regresión.

Las concentraciones halladas de trans-resveratrol durante las dos extracciones para cada muestra de vino tinto borgoña, son detalladas en **TABLA N° 13**.

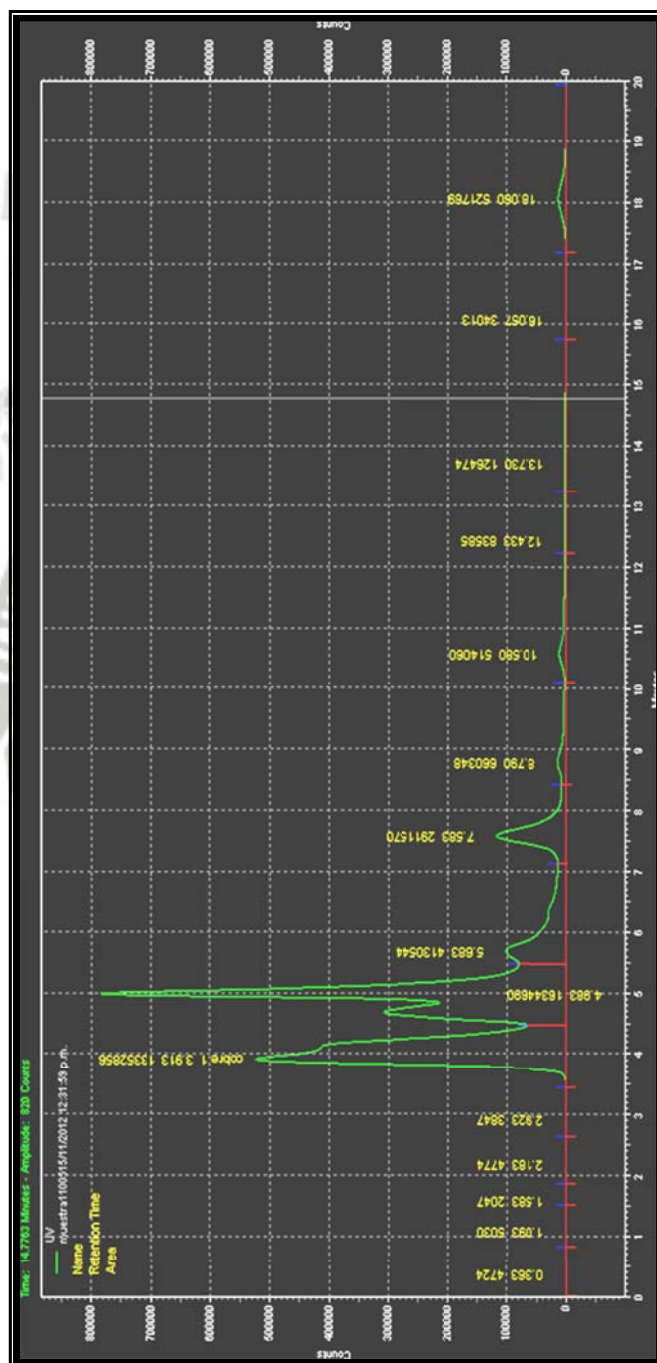


FIGURA N° 15.- Identificación de trans-resveratrol en muestra de vino.

TABLA N° 13.- Contenido de trans-resveratrol en dos extracciones de vinos borgoña peruanos

MUESTRAS	PRIMERA EXTRACCIÓN	SEGUNDA EXTRACCIÓN		
	Trans-resvratrol(mg/L)	Trans-resveratrol(mg/L)		
1	2,03	1,96	\bar{x}	1,99
	1,99	1,97	DS	0,02
	1,98	1,98	C.V%	1,21
2	1,62	1,63	\bar{x}	1,63
	1,65	1,63	DS	0,01
	1,66	1,63	C.V%	0,82
3	2,87	2,89	\bar{x}	2,90
	2,87	2,96	DS	0,05
	2,86	2,97	C.V%	1.74
4	1,74	1,57	\bar{x}	1,66
	1,68	1,59	DS	0,07
	1,72	1,62	C.V%	4,21
5	2,04	2,14	\bar{x}	2,10
	2,15	2,06	DS	0,05
	2,14	2,08	C.V%	2,18
6	2,08	2,06	\bar{x}	2,09
	2,05	2,10	DS	0,04
	2,17	2,06	C.V%	2,09
7	3,33	3,25	\bar{x}	3,27
	3,34	3,25	DS	0,07
	3,30	3,17	C.V%	2,00
8	1,82	1,74	\bar{x}	1,79
	1,83	1,80	DS	0,04
	1,82	1,73	C.V%	2,28

FUENTE: Elaboración propia

Con la determinación de *trans-resveratrol* por cromatografía líquida de alta resolución en vinos tinto borgoña, se obtuvo niveles de *resveratrol* entre 1,63 mg/L y 3,27 mg/L, siendo el vino borgoña de marca Paz Soldán que presentó el mayor nivel de *trans-resveratrol* y el vino tinto borgoña de marca Quenta que presentó el menor nivel de *trans-resveratrol*.

Para una mejor identificación en la **TABLA N° 14** se señala la marca del vino tinto borgoña peruano así como el contenido de *trans-resveratrol* y la desviación estándar correspondiente a cada muestra.

TABLA N° 14.- Niveles de *trans-resveratrol* en vinos tinto borgoña peruanos.

MUESTRAS	NIVEL DE TRANS-RESVERATROL (mg/L)	S.D
Santiago Queirolo	1,99	0,02
Quenta	1,63	0,01
Hacienda del abuelo	2,90	0,05
Reinoso	1,66	0,07
Tabernerero	2,10	0,05
Majes tradición	2,09	0,04
Paz soldán	3,27	0,07
Viña vieja	1,79	0,04

FUENTE: Elaboración propia

Las muestras de vino presentan un valor medio de *trans-resveratrol* de 2,18 mg/L, siendo éste nivel mayor para vinos de diferentes procedencias (EUA: 1,30 mg/L, Japón: 0,57 mg/L, Canadá: 0,77 mg/L, Grecia: 0,873 mg/L, Portugal:1 mg/L, Chile/Argentina: 1,21 mg/L, [80],Brasil: 2,75 mg/L[39][73]

Las diferencias observadas entre vinos de diferentes procedencias pueden ser debidas a un conjunto de características, que reúne aspectos relacionados con el suelo, el clima y características locales.

3.3. USO DE CARTUCHOS PARA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)

Los cartuchos para SPE **FIGURA N° 16** fueron adquiridos de la casa Merck quien recomienda realizar una sola SPE por cartucho, debido a que los cartuchos tienen un precio relativamente alto, se realizó más de una extracción por cartucho para las diluciones patrón como para las muestras de vinos tinto borgoña.

Antes de usar cada cartucho tanto para las diluciones patrón de trans-resveratrol como para las muestras de vinos tinto borgoña, se realizó un adecuado lavado de cada cartucho.



FIGURA N° 16. –Cartucho para SPE.

Para la elaboración de las tres curvas de calibración, de cinco niveles de concentración cada una, se usaron cinco cartuchos para SPE. Para la elaboración de la segunda y tercera curva de calibración se realizaron extracciones mediante los cartuchos usados

en la primera curva de calibración. Las respuestas (áreas) fueron muy similares para las tres curvas de calibración.

Se realizó un análisis de varianza ANOVA, para determinar si existía diferencia significativa en el reuso de los cartuchos, el mismo que se realizó para determinación del análisis de varianza para la linealidad del método.

En el análisis de varianza ANOVA, se observó que el valor de F experimental es mayor que el valor de F tabla, con lo que se tuvo evidencia experimental para rechazar la hipótesis alternativa establecida y aceptar la hipótesis nula, es decir que existe evidencia experimental para afirmar que las áreas de los cinco niveles de concentración de las tres curvas de calibración son significativamente iguales.

Al no existir estadísticamente diferencia significativa en las áreas de las tres curvas de calibración, elaboradas con una sola batería de cartuchos, podemos decir que los cartuchos para SPE son reusables al menos por tres veces consecutivas, para la extracción de disoluciones de estándar de *trans*-resveratrol, con un nivel de confianza de 95%

Para la determinación de *trans*-resveratrol en ocho vinos tinto borgoña se usaron ocho cartuchos para SPE, determinándose a su vez que los cartuchos para SPE son reusables para las muestras de vinos tinto borgoña.

Se realizaron dos extracciones consecutivas en un solo cartucho para la misma muestra de vino, las respuestas (áreas) fueron muy similares para las dos extracciones realizadas. Se realizó un análisis estadístico de t- pareado, para determinar si no existe diferencia significativa al realizar dos extracciones en un solo cartucho para las muestras de vinos tinto borgoña. Para el análisis estadístico de t-pareado que es detallado en la **TABLA N° 15**, se presentaron también las medias aritméticas de las inyecciones hechas por triplicado para cada muestra de vino tinto borgoña. .

TABLA N° 15.- Análisis estadístico de t- pareado

	PRIMERA EXTRACCIÓN (área)	SEGUNDA EXTRACCIÓN (área)	Diferencia	
1	2939898,67	2893898,00	46000,67	
2	2411177,67	2389369,67	21808,00	
3	4206522,33	4317552,00	-111029,67	
4	2518949,00	2345758,33	173190,67	
5	3098343,67	3071365,00	26978,67	
6	3086270,33	3042899,33	43371,00	
7	4882238,33	4597438,67	284799,67	
8	2673543,67	2452106,67	221437,00	
			88319,50	\bar{x}
			128321,95	D.S

FUENTE: Elaboración propia

El análisis estadístico de t-pareado, se basó en dos hipótesis detalladas a continuación:

HIPOTESIS NULA H_0 : no hay diferencia significativa entre las áreas obtenidas en la primera y segunda extracción.

HIPOTESIS ALTERNATIVA H_1 : si hay diferencia significativa entre las áreas obtenidas en la primera y segunda extracción.

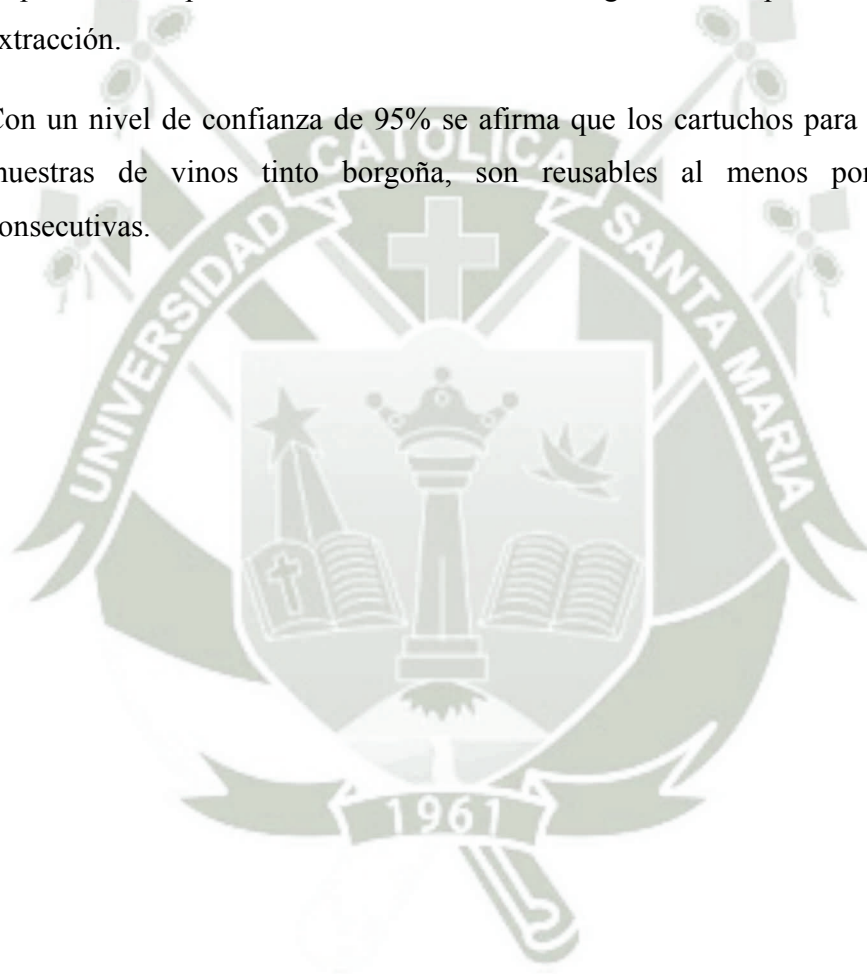
Se determinó el valor de $t_{\text{experimental}}$ hallado con la siguiente fórmula:

$$t = \frac{\bar{d}\sqrt{n}}{SD}$$

Obteniéndose como valor para t experimental: 1,947 y para t_{tabla} : 2,365 para $8-1=7$ grados de libertad con un nivel de confianza de 95%.

Siendo el valor de t_{tabla} menor que el valor de $t_{\text{experimental}}$ se tiene evidencia experimental para aceptar la hipótesis nula, con la que se puede afirmar que la respuesta de la primera extracción realizada es igual a la respuesta de la segunda extracción.

Con un nivel de confianza de 95% se afirma que los cartuchos para SPE para las muestras de vinos tinto borgoña, son reusables al menos por dos veces consecutivas.



CONCLUSIONES

1. Se desarrollo y se validó un método de análisis preciso, exacto y repetible, así como sencillo, rápido y ahorrativo de solventes comparada con una extracción liquido -liquido convencional.
2. El método de extracción en fase sólida (SPE) para el *trans*-resveratrol en vinos tintos borgoña peruanos permitió su óptima extracción y junto a las condiciones cromatográficas establecidas en la presente tesis, se pudo cuantificar de manera exitosa el *trans*-resveratrol en los vinos tintos borgoña.
3. La metodología validada se encuentra dentro de las especificaciones, por lo cual se concluye que es idónea y confiable para la determinación del *trans*-resveratrol en vinos borgoñas.
4. Se obtuvo como nivel máximo de *trans*-resveratrol 3,27 mg/L en el vino borgoña Paz Soldán y 1,63 mg/L como nivel mínimo de *trans*-resveratrol en el vino borgoña Quenta.
5. Se demostró que los cartuchos para SPE para el estándar de *trans*-resveratrol, son reusables por lo menos tres veces consecutivas así como también reusables para la SPE de muestras de vinos tintos borgoña por lo menos dos veces.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar la determinación de los niveles de trans-resveratrol en vinos tintos secos, producidos en nuestro país, ya que podrían contener un mayor nivel de trans-resveratrol que los vinos elaborados de uva Isabella conocida nacionalmente como “uva borgoña”.
2. La determinación de los niveles trans resveratrol podría ser hallado en uva Isabella, para comparar como los diversos procesos de vinificación influyen en el contenido de dicho antioxidante.
3. La determinación del color de cada muestra podría realizarse por espectrofotometría UV, para conocer si el color de cada vino influye en el contenido de los niveles de trans-resveratrol en las muestras.
4. Para definir algunas de las características de los vinos podría determinarse el grado de acidez y el contenido de azúcares.
5. Es recomendable realizar la dterminacion de compuestos fenolicos en las muestras de vino y establecer si existe correlación con los niveles de trans-resveratrol obtenidos en la presente tesis de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] ABE, L. T.; MOTA, R. V. da ; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinífera*
- [2] Abd El-Mohsen M, Bayele H, Kuhnle G, Gibson G, Debnam E, Kaila Srari S, Rice-Evans C, Spencer JP, Distribution of [3H]trans-resveratrol in rat tissues following oral administration, *Br J Nutr.* 2006 Jul;96(1):62-70.
- [3] Aldo Todaro, Rosa Palmeri, Ricardo N. Barbagallo, Pier Giorgio Pifferi, Giovanni Spagna, Increase of trans resveratrol in typical Sicilian wine using β -glucosidase from various sources, *Food Chemistry* 107 (2008) 1570-1575.
- [4] AMARAL, F. M.; CARO, M. S. B. Investigation of different pre-concentration methods for NMR analyses of Brazilian white wine. *Food Chemistry*, v. 93, n. 3, p. 507-510, 2005.
- [5] André A. Souto, Manuel C. Carneiro, Marcus Seferin, Marcos J.H. Senna, Andressa Conz, Kristiane Gobbi, Determination of *trans*-Resveratrol Concentrations in Brazilian Red Wines by HPLC, *Journal of Food Composition and Analysis*, Volume 14, Issue 4, August 2001, Pages 441–445
- [6] Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y, Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies, *Anticancer Res.* 2004 Sep-Oct;24(5A):2783-840

[7] BORDONE, L.; MOTTA, M. C.; PICARD, F.; ROBINSON, A.; JHALA, U. S.; APFELD, J.; McDONAGH, T.; LEMIEUX, M.; McBURNEY, M.; SZILVASI, A.; EASLON, E. J.; LIN, S. J.; GUARENTE, L Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. PLoS Biology, v. 4, n. 2, p. 210-220, 2006.

[8] Brent C. Trela, Andrew L. Waterhouse, Resveratrol: Isomeric Molar Absorptivities and Stability, J. Agric. Food Chem., 1996, 44 (5), pp 1253–1257

[9]BUJANDA, L.; GUTIÉRREZ S. M.Á.; MARIMÓN, J. M. El vino a dosis moderadas: salud o enfermedad. PUBLICADO EN MED CLIN BARC. 1999;112:29-35. - VOL.112 NÚM 1

[10] BUJANDA, L; GARCÍA-BARCINA, M; COSME, A; ARENAS, JI. Consumo moderado de alcohol y mortalidad por diversas causas. ATEN PRIMARIA. VOL.37 NÚM 04, 37:245. 2006.

[11]C. Dominguez, D.A. Guillen, C.G. Barroso, Automated solid-phase extraction for sample preparation followed by high performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection for the analysis of resveratrol derivatives in wine, Journal of Chromatography A, 918 (2001) 302-310, 2001.

[12]CALDÚ, P.; HURTADO, I.; RAMON, J. M.; ANTOLÍ, R.; GONZALO, A.; MÍNGUEZ, S.; FIOL, C. Modificación de la susceptibilidad de la lipoproteína de baja densidad a la oxidación tras la ingestión de vino. PUBLISHED IN MED CLIN BARC. 1998;111:451-5. - VOL.111 NÚM 12.

[13]CAMUSSONI, G.; CARNEVALI, E.. DETERMINACION COMPARATIVA DEL CONTENIDO DE FLAVONOIDES EN VINOS TINTOS DE ORIGEN

ARGENTO. Invenio, Universidad del Centro Educativo Latinoamericano Rosario Argentina, v. 7, 013, pp.151-159, 2004

[14] Cantos E., E.; Guerrero, R. F.; Puertas, B.; Jiménez, M. J.; Jurado, M. S. Tratamiento postcosecha de uva de vinificación con radiación UVC para obtención de vinos enriquecidos en resveratrol Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, Vol. 8, Núm. 2, sin mes, 2007, pp. 112-120 Asociación Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, S.C.

[15] DANZ, E. D. B.; SKRAMSTED, J.; HENRY, N.; BENNETT, J. A.; KELLER, R. S. Resveratrol prevents doxorubicin cardiotoxicity through mitochondrial stabilization and the Sirt1 pathway. Free Radical Biology and Medicine, v. 46, n. 12, p. 1589-1597, 2009.

[16] DELLA-MORTE, D.; DAVE, K. R.; DeFAZIO, R. A.; BAO, Y. C.; RAVAL, A. P.; PEREZPINZON, M. A. Resveratrol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a Sirtuin 1–Uncoupling Protein 2 pathway. Neuroscience, v. 159, p. 9931002, 2009.

[17] DURÁN O, Daniel S; TRUJILLO N, Yanine Y. ESTUDIO COMPARATIVO DEL CONTENIDO FENÓLICO DE VINOS TINTOS COLOMBIANOS E IMPORTADOS Vitae, vol. 15, núm. 1, enero, 2008, pp. 17-24 Universidad de Antioquia Medellín, Colombia)

[18] ECTOR, B. J. ; MAGEE, J. B. ; HEGWOOD, C. P. ; COIGN, M. J. ; 1996 : Resveratrol concentration in Muscadine berries, juice, pomace, purees, seeds and wines . Amer. J. Enol. Viticult. 47, 57-62 .

- [19] Edwin N. Frankel , Andrew L. Waterhouse , Pierre L. Teissedre. Principal phenolic phytochemicals in selected california wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.*, 1995, 43 (4), pp 890–894
- [20] E.N Frankel , J Kanner , JB German , E Parks , JE Kinsella . Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine *The Lancet*, Volume 341, Issue 8843, Pages 454 - 457, 20 February 1993.
- [21]ejoo Olalla, Moreno Anxela, Falqué Elena, Content of trans- and cis-resveratrol in Galician white and red wines, *Journal of food composition and analysis*, 2008 Dec., v. 21, issue 8
- [22] Fernández, A. G.; Muñoz A. M. J.; Cambillo, E. N. M.; Ramos F.E.; Alvarado, C. O. U. Efecto del consumo moderado de vino tinto sobre algunos factores de riesgo cardiovascular. *Acta méd. peruana* v.24 n.3 Lima sep./dic. 2007.
- [23] Frémont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 2000 Jan 14;66(8):663-73.
- [24] GABAS, N., RATSIMBA, B., GERBAUD, V. Les sels tartriques dans les vins: solubilité et sursaturation. In: *la microbiologie des vins mousseux: la stabilisation des vins – mécanismes et évaluation.* TOULOUSE : LALLEMAND, 1994. 95-98P.
- [25]German JB, Walzem RL. The health benefits of wine. *Annu Rev Nutr.* 2000;20:561-93.
- [26]GOLDBERG, D. M.; YAN, J.; NG, E.; DIAMANDIS, E. P.; KARUMANCHIRI, A.; SOLEAS, G.; WATERHOUSE, A. L. A global survey of trans-resveratrol

concentration in commercial wine: preliminary survey of its concentration in commercial wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 46, n. 2, p. 159-165, 1995.

[27] Hernandez, C.; J.; Duran, O. D.; Trujillo, N. Y. Potencial fenólico de la variedad isabella (*vitis labrusca* L.) Producida en villa del rosario norte de santander-colombia. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, vol. 8, núm. 1, enero-junio, 2010, Universidad de Pamplona, Colombia

[28] Ingham, J. L. 1976. 3,5,4'-Trihydroxystilbene as a phytoalexin from groundnuts (*Arachis hypogaea*). *Phytochemistry* 1976, 15, 1791-1793

[29] INFANTE, R. Polifenoles del vino y oxidabilidad de las lipoproteínas ¿blanco o tinto?. EN *CLIN. INVEST. ARTERIOESCLEROSIS*, 1997, N°9, PP.19-22)

[30] Informe de registro de productores de uva en las regiones de Ica, Arequipa, Moquegua, Tacna y Lima provincias. DIRECCIÓN GENERAL DE INFORMACIÓN AGARARIA. Lima, Setiembre 2008

[31] Jacobo Elías Gomez, Efectos de los isómeros del resveratrol sobre la homeostasis del calcio y del óxido de nitrógeno en células vasculares, Universidad Santiago de Compostela, 2009.

[32] Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C., Pezzuto, J.M.: «Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes», *Science* 1997; 275: 218-220

[33]JEANDET, P.; BESSIS, R.; GAUTHERON, B. The production of resveratrol (3, 5, 4')trihydroxystilbene by grape berries in different development stages. American Journal of Enology and Viticulture, v. 42, p. 41-46, 1991.

[34] JHUMKA, Z.; PERVAIZ, S.; CLÉMENT, M. V. Resveratrol regulates the expression of NHE-1 by repressing its promoter activity: Critical involvement of intracellular H and caspases 3 and 6 in the absence of cell death. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 41, p. 945-956, 2009.

[35] Jian Zhou, Hua Cui, Guohui Wan, Hong Xu, Yongqiang Pang, Chunfeng Duan, Direct analysis of *trans*-resveratrol in red wine by high performance liquid chromatography with chemiluminescent detection, Food Chemistry, Volume 88, Issue 4, December 2004, Pages 613–620

[36] J.M. Leiro, M. Varela, M.C. Piazzon, J.A. Arranz, M. Noya, J. Lamas, The antiinflammatory activity of the polyphenol resveratrol may be partially related to inhibition of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) pre-mRNA splicing, Mol. Immun. 47 (2010) 1114–1120.

[37] JUAN A. SANCHEZ, MAHESH THIRUNAVUKKARASU, NILANJANA MAULIK. Chapter 33 - The effects of resveratrol on diabetes and obesity. Nutritional and Therapeutic Interventions for Diabetes and Metabolic Syndrome, p. 413–430,2012.

[38] Juan Juan Ren, Hai Yan Liu, Yu Hong Hao, Pin Gang He, Yu Zhi Fang, Determination of *trans* resveratrol in red wine by solid phase extraction-flow injection chemiluminescence method. Chinese Chemical Letters 18 (2007) 985–988

[39]KINSELLA, J.E., FRANKEL,E., GRMAN, B., KANNER, J. Possible mechanisms for the protectie role of antioxidants in wine and plant food. EN FOOD TECHNOLOGY, 1993, N° 85-89

[40]LANGCAKE, P.; PRYCE, R. J. The production of resveratrol by Vitits vinifera and other members of the Vitaceaeas a response to infection or injury. Physiological and Molecular Plant Pathology, v. 9, p. 77-86, 1976.

[41] LANGCAKE, P.; PRYCE, R. J. The production of resveratrol by Vitits vinifera and other members of the Vitaceaeas a response to infection or injury. Physiological and Molecular Plant Pathology, v. 9, p. 77-86, 1976.

[42] LLAUDY, F. M. C. CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO. Universitat Rovira i Virgili, 2006.

[43] Lorenzo Huertas Vallejos HISTORIA DE LA PRODUCCIÓN DE VINOS Y PISCOS EN EL PERÚ. Revista Universum No 19 Vol. 2: 44 - 61, 2004

[44] Martin Deak, Heinz Falk, On the Chemistry of the Resveratrol Diastereomers, Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly, May 2003, Volume 134, Issue 6, pp 883-888

[45]MARASCHIN, R. P.; IANSEN, C.; ARSEGO, J. L.; CAPEL, L. S.; DIAS, P. F.; ZANUS, C.; CARO, M. S. B.; MARASCHIN, M. Solid-phase extraction and 1H-NMR analysis of Brazilian Cabernet Sauvignon Wines - A chemical composition correlation study. Proceedings of the Royal Society of London Series A-Mathematical and Physical Sciences, v. 1, n. 1, p. 255-260, 2003

[46] MARASCHIN, M.; PASSOS, R.; SIBILA, P. S.; OLTRAMARI, A. C.; SILVA, J. M. O. D.; DIAS, P. F. ; FONTANA, J. D.; CARO, M. S. B. Isolation and trans-resveratrol analysis in Brazilian red wines by ¹H-Nuclear Magnetic Resonance. In: International Conference on Applications of Magnetic Resonance in Food Science, 5., 2000, Aveiro. Proceedings. Aveiro: University of Aveiro – Portugal, 2000. p. 37

[47] M.A. Murcia, M. Martínez-Tomé, Antioxidant activity of resveratrol compared with common food additives, *J. Food Prot.* 64 (2001) 379–387

[48] M.A. Rodríguez Delgado; G. González Hernández; F.J. García Montelongo; J.P. Pérez Trujillo, Contenido en trans resveratrol de los vinos tintos de Tenerife, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Universidad de La Laguna. Tenerife. España. Jornadas Técnicas Vitivinícolas Canarias.

[49] M.N. Bravo, R. Feliciano, S. Silva, A.V. Coelho, L. Vilas Boas, M.R. Bronze, Analysis of *trans*-resveratrol: Comparison of methods and contents in Muscatel fortified wines from Setúbal region in Portugal, *Journal of Food Composition and Analysis*, Volume 21, Issue 8, December 2008, Pages 634–643

[50] Micol M. Vicente, Alto contenido en resveratrol en vinos de la variedad monastrell de la denominación de origen “bullas” , Centro de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández

[51] Maria Gerogiannaki-Christopoulou, Panagiotis Athanasopoulos, Nikolaos Kyriakidis, Ifigenia A. Gerogiannaki, Michalis Spanos, trans resveratrol in wines from

the major Greek red and white grape varieties, *Food Control* Volume 17, Issue 9, September 2006, Pages 700–706

[52] Mihasina Rabesiaka, Lovasoa Rakotondramasy-Rabesiaka, Isabelle Mabile, Catherine Porte, Jean-Louis Havet, Extraction of *trans*-resveratrol from red wine and optimization by response surface methodology, *Separation and Purification Technology*, Volume 81, Issue 1, 5 September 2011, Pages 56–61

[53] Molina-García L, Ruiz-Medina A, Córdova ML. An automatic optosensing device for the simultaneous determination of resveratrol and piceid in wines, *Anal Chim Acta*. 2011 Mar 18;689(2):226-33. doi: 10.1016/j.aca.2011.01.052. Epub 2011 Feb 3.

[54]MOLNÁR, V.; BILLES, F.; TYIHÁK, E.; MIKOSCH, H. Theoretical study on the vibrational spectra of methoxy- and formyl-dihydroxy-*trans*-stilbenes and their hydrolytic equilibria. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 69, n. 2, p. 542-558, 2008.

[55] Nuno Ratola1, Joaquim Luís Faria, Arminda Alves, Analysis and Quantification of *trans*-Resveratrol in Wines from Alentejo Region (Portugal), *Food Technol. Biotechnol.* 42 (2) 125–130 (2004)

[56]PALSAMY, P.; SUBRAMANIAN, S. Modulatory effects of resveratrol on attenuating the key enzymes activities of carbohydrate metabolism in streptozotocin–nicotinamideinduced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, v. 179, p. 356-362, 2009.

[57] Partha S Ray*, Gautam Maulik†, Gerald A Cordis*, Alberto A.E Bertelli‡, Aldo Bertelli§, Dipak K Das*, The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. *Free Radical Biology and Medicine* Volume 27, Issues 1–2, July 1999, Pages 160–169

[58] RIVERA, L.; MORÓN, R.; ZARZUELO, A.; GALISTEO, M. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochemical Pharmacology*, v. 77, p. 1053- 1063, 2009.

[59] R. T. THRELFALL', J. R. MORRIS 2 , and A. MAUROMOUSTAKOS Effect of Variety, Ultraviolet Light Exposure, and Enological Methods on the trans-Resveratrol Level of Wine, *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol. 50, No. 1, 1999

[60] Rodrigo Salazar , Giovana Espinoza , Candy Ruiz , María de Fátima Fernández , Rosario Rojas. Compuestos fenólicos, actividad antioxidante, contenido de trans-resveratrol y componentes de aroma de 8 vinos peruanos. *Rev Soc Quím Perú*. 77 (2) 2011.

[61] RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A.; GONZÁLEZ, G.; PÉREZ-TRUJILLO, J. P.; GARCÍAMONTELONGO, F. J. Trans-resveratrol in wines from the Canary Islands (Spain). Analysis by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, v. 76, n. 3, p. 371-375, 2002.

[62] S. Malovaná, Gercía Montelongo, J.P.Pérez, M.A. Rodriguez-Delgado, Optimisation of sample preparation for the determination of trans-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta* 428 (2001) 245-253

[63] Sáenz J. F, Torres C. Manrique, Gutiérrez A.R. Viguera, Tenorio C. Rodríguez, Sanz S. Cervera, Flora lactic implicada en las vinificaciones del Rioja -94 evolución y caracterización, Departamento de Agricultura y Alimentación. Universidad de La Rioja, 1994.

[64] SAIKO, P.; SZAKMARY, A.; JAEGER, W.; SZEKERES, T. Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? Mutation Research, v. 658, n. 1-2, p. 68-94, 2008.

[65] SALAZAR, R.; ESPINOZA, G.; RUIZ, C.; FERNANDEZ, M.; ROJAS., R. Compuestos fenolicos, actividad antioxidante, contenido de resveratrol y componentes de aroma de 8 vinos peruanos. Unidad de investigación en Productos Naturales. Laboratorio de investigación y desarrollo, Facultad de ciencias y Filosofía. Universidad Cayetano Heredia, 2011.

[66] Scola, G.; Demarchi, K. V.; Fonseca, M. J. C.; Dal-Pizzol, F.; Salvador, M., 1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DE SEMENTES DE RESÍDUOS DE VINIFICAÇÃO DE VITIS LABRUSCA. Cienc. Rural vol.41 no.7 Santa Maria July 2011

[67] Sobolev VS, Cole RJ. trans-resveratrol content in commercial peanuts and peanut products J Agric Food Chem. 1999 Apr;47(4):1435-9.

[68] SOUTO, A. A.; CONZ, A.; GOBBI, K.; CARNEIRO, M. C.; SEFERIN, M. Determinação de trans-resveratrol em vinhos gaúchos por HPLC. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 23., 2000, Poços de Caldas. Anais... Poços de Caldas: SBQ, 2000.

[69] SPINELLI, F. R.; VANDERLINDE, R.; DUTRA, S. V.; PEDRUZZI, I.; MARCON, A. R.; BALARDIN, P. B. Teores de resveratrol em vinhos do Rio Grande do Sul. In: Reunião Anual da SBPC, 58., 2006, Florianópolis. Anais... Florianópolis: SBPC, 2006.

[70] Stervbo, U.; Vang, O.; Bonnesen, C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chemistry* v., 101, Issue 2, p., 449–457, 2007.

[71] Subhendu M., Istvan L., Narasimman G., Alberto A.A.B., Dipak K. D. Expression of the longevity proteins by both red and white wines and their cardioprotective components, resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol, *Free Radical Biology & Medicine*, v. 46 p., 573–578, 2009

[72] Tomé-Carneiro J, González M, Larrosa M, García-Almagro FJ, Avilés-Plaza F, Parra S, Yáñez-Gascón MJ, Ruiz-Ros JA, García-Conesa MT, Tomás-Barberán FA, Espín JC. Consumption of a grape extract supplement containing resveratrol decreases oxidized LDL and ApoB in patients undergoing primary prevention of cardiovascular disease: a triple-blind, 6-month follow-up, placebo-controlled, randomized trial. *Mol Nutr Food Res*, 56(5):810-21, 2012.

[73] Ulrik Stervbo, Ole Vang, Christine Bonnesen, A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine, *Food Chemistry*, Volume 101, Issue 2, 2007, Pages 449–457

[74] URPI-SARDA, M.; ZAMORA-ROS, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.; CHERUBINI, A.; JAUREGUI, O.; TORRE, R. de la; COVAS, M. I.; ESTRUCH, R.; JAEGER, W.; ANDRES-LACUEVA, C. HPLC–Tandem mass spectrometric method

to characterize resveratrol metabolism in humans. *Clinical Chemistry*, v. 53, n. 2, p. 292-299, 2007.

[75] Vitaglione P, Sforza S, Galaverna G, Ghidini C, Caporaso N, Vescovi PP, Fogliano V, Marchelli R, Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans, *Mol Nutr Food Res*. 2005 May;49(5):495-504.

[76] Vitrac X, Desmoulière A, Brouillaud B, Krisa S, Deffieux G, Barthe N, Rosenbaum J, Mérillon JM, Distribution of [14C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration, *Life Sci*. 2003 Apr 4;72(20):2219-33.

[77] WELLINGTON C.G. caracterização do potencial antioxidante de vinhos e quantificação de fenóis totais e trans-resveratrol utilizando técnicas cromatográficas e espectroscópicas multivariadas. Universidade Federal do Paraná. CURITIBA, 2010

[78] Wenzel E, Somoza V., Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol, *Mol Nutr Food Res*. 2005 May;49(5):472-81.

[79] Wenzel E, Soldo T, Erbersdobler H, Somoza V, Bioactivity and metabolism of trans-resveratrol orally administered to Wistar rats, *Mol Nutr Food Res*. 2005 May;49(5):482-94.

[80] ZHANG, W. J.; BJÖRN, L. O. The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. *Fitoterapia*, v. 80, p. 207-218, 2009.

[81]ZHANG, Y.; LI, S. Z.; LI, J.; PAN, X.; CAHOON, R. E.; JAWORSKI, J. G.; WANG, X.; JEZ, J. M.; CHEN, F.; YU, O. Using unnatural protein fusions to engineer resveratrol biosynthesis in yeast and mammalian cells. *Journal of the American Chemical Society*, v. 128, n. 40, p. 13030-13031, 2006.

[82] Xiangguo Yue, Wei Zhang, Maicun Deng, Hyper production of ¹³C labeled trans resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cell culture by elicitation and in situ adsorption, *Biochemical Engineering Journal* Volume 53, Issue 3, 15 February 2011, Page 292–296

[83] Xilan Sun, Bin Peng, Weidong Yan, Measurement and correlation of solubility of trans-resveratrol in 11 solvents at T = (278.2, 288.2, 298.2, 308.2, and 318.2) K, *J. Chem. Thermodynamics* 40 (2008) 735–738

[84] A. Braithwaite y F.J. Smith, *Chromatographic Methods*, Blackie Academic & Professional, 5a Ed., Glasgow, 1996

[85] *High Performance Liquid Chromatography, Analytical Chemistry by Open Learning*, John Wiley & Sons, Chichester, 1998

[86] Luis Hidalgo Fernandez-Cano, Jose Hidalgo Togoires. 4^o edición, 2011, Ediciones Mundi-Prensa.

[87] L.I. R. Snyder, J.J. Kirkland y J.L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, John Wiley & Sons., New York, 1997

[88] Sandie Lindsay, *High Performance Liquid Chromatography Second Edition*.

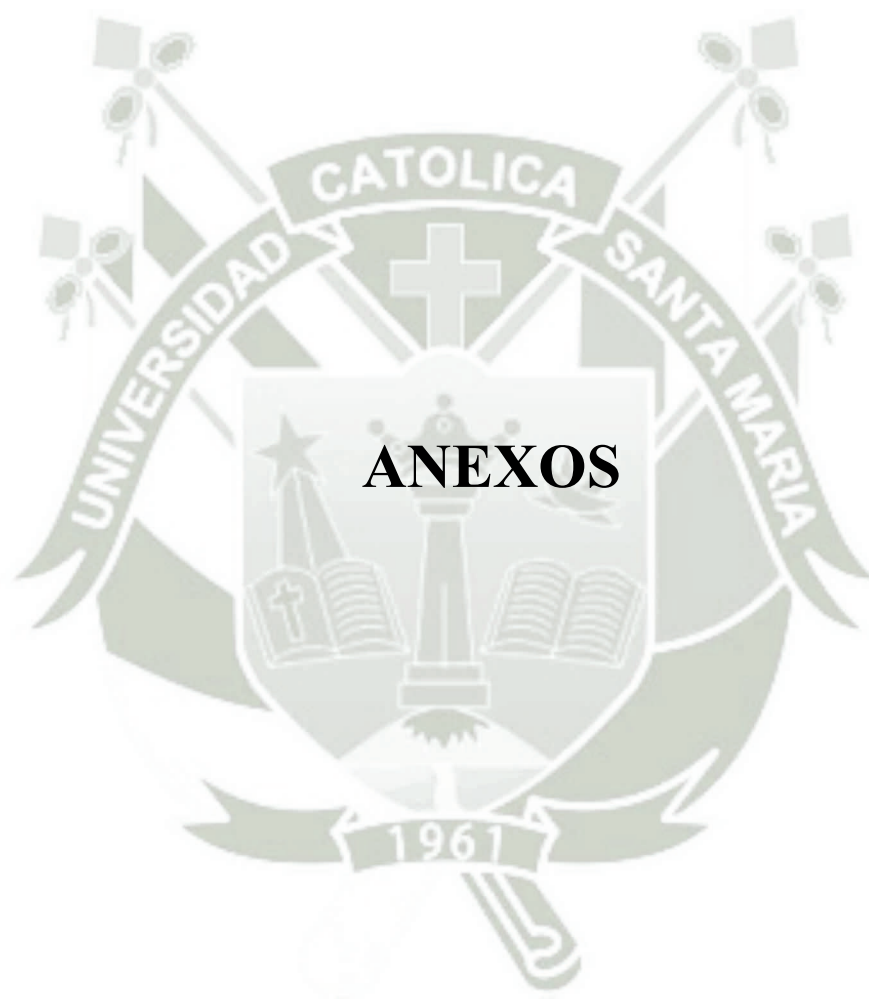
[89] USP30-validación de procedimientos farmacopeicos

[90] http://www.merckmillipore.com/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/Merck-International-Site/es_ES//USD/ViewPDFPrint.pdf?RenderPageType=ProductDetail&CatalogCategoryID=P1ub.s1LUYkAAA EWquAfVhTI&ProductUUID=jO.b.s1OKM8AAA EW0wAW4z8N&PortalCatalogUID=t02b.s1LX0MAAAEWc9UfVhTI

[91] Enología: fundamentos científicos y tecnológicos, Claude Flanzky, Segunda edición, 2003.

[92] Tratado de nutrición, Manuel. Hernandez Rodriguez, A. Sastre Gallego, 1999





ANEXO N° 1

TABLA N°1.- Identificación codificada de muestras de vinos analizados

MUESTRA	MARCA	AÑO	LOTE
M-01	Santiago Queirolo	2012	LT-A06-0-020712
M-02	Quenta	2011	LT:V550011111
M-03	Hacienda del abuelo	2012	VB1202
M-04	Reinoso	2010	01B6010
M-05	Tabernero	2012	VB1202
M-06	Majes tradición	2012	L2F:07-12
M-07	Paz soldán	2012	01505
M-08	Viña vieja	2010	V02010

ANEXO N° 2

TABLA N° 2.- Proporción de fase móvil

PROPORCIÓN FASE MÓVIL (V/V)	
Acetonitrilo	Agua pH:3*
30	70

ANEXO N° 3

TABLA N° 3.- Condiciones cromatográficas establecidas

PARÁMETROS	ESTÁNDAR	MUESTRA
Fase estacionaria:	Dos pre-columnas	Dos pre-columnas
Tiempo de estabilización	25min	25min
Flujo:	0.7ml/min	0.7ml/min
Longitud de onda:	310nm	310nm
Tiempo de corrida:	10min	20min

ANEXO N° 4

TABLA N°4.- concentración de disoluciones patrón en mg/L equivalente a ul.

Solución stock (uL)	Concentración mg/L
12,3	0,5
36,8	1,5
61,3	2,5
85,9	3,5
110,3	4,5

ANEXO N° 5.

TABLA N° 5. Concentraciones para Curva de Calibración.

	CONCENTRACION
SOLUCION STOCK	$\frac{10,30\text{mg}}{0,01\text{L}} = \frac{1030\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{99\%}{100\%} = 1019,70 \text{ mg/L}$
DILUCIONES PARA CURVA DE CALIBRACION	$\frac{1019,70\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{0,0000123\text{L}}{0,025\text{L}} = 0,5017 \text{ mg/L}$
	$\frac{1019,70\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{0,0000368\text{L}}{0,025\text{L}} = 1,5001 \text{ mg/L}$
	$\frac{1019,70\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{0,0000613\text{L}}{0,025\text{L}} = 2,5003 \text{ mg/L}$
	$\frac{1019,70\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{0,0000859\text{L}}{0,025\text{L}} = 3,5036 \text{ mg/L}$
	$\frac{1019,70\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{0,0001103\text{L}}{0,025\text{L}} = 4,5001 \text{ mg/L}$

ANEXO N° 6.

TABLA N° 6.-Áreas obtenidas por triplicado de los cinco niveles de concentración para las tres curvas de calibración

		CURVA - 1	CURVA - 2	CURVA - 2
	Concentración mg/L	Área (Hz)	Área (Hz)	Área (Hz)
1	0.50	766024	766024	685795
2	0.50	760603	788439	632181
3	0.50	764346	731692	666681
4	1.50	2256183	2145831	2146573
5	1.50	2240919	2251972	2146350
6	1.50	2235023	2176036	2152917
7	2.50	3570071	3561560	3666520
8	2.50	3534628	3575623	3598795
9	2.50	3517020	3580275	3670203
10	3.50	4846827	4798707	4799212
11	3.50	4862546	4804384	4774704
12	3.50	4855301	4785057	4787379
13	4.50	6233560	6117036	6287972
14	4.50	6271098	6140671	6159254
15	4.50	6249658	6177869	6182399

ANEXO N° 7.

TABLA N° 7.- Resultados de la linealidad del método para patrones de trans-resveratrol

	X	Y	X*Y	X ²	Y ²	F=(Y/X)
1	0.50	729087.22	365775.77	0.25	5.32E+11	1453262.42
2	1.50	2194644.89	3294140.03	2.25	4.82E+12	1462131.59
3	2.50	3586077.22	8966268.88	6.25	1.29E+13	1434258.78
4	3.50	4812679.67	16861704.48	12.25	2.32E+13	1373638.45
5	4.50	6202168.56	27910378.72	20.25	3.85E+13	1378229.05
Σ	12.51	17524657.56	57398267.88	41.28	79836764575143.80	7101520.28
\bar{x}	2.50	3504931.51				1420304.06
D.S						41768.75

ANEXO N° 8

TABLA N° 8. Ajuste por el método de los mínimos cuadrados

	X ₁	Y ₁	X ²	\hat{Y}_1	Y ₁ - \hat{Y}_1	(Y ₁ - \hat{Y}_1) ²	X ₁ - X	(X ₁ - X) ²
1	0.50	729087.22	0.251692856	792462.3807	-63375.16	4016410710	-2.00	3.998584125
2	1.50	2194644.89	2.25297098	2147987.51	46657.38	2176911038	-1.00	1.00069212
3	2.50	3586077.22	6.25150009	3503526.203	82551.02	6814670715	0.00	1.0733E-06
4	3.50	4812679.67	12.27521296	4864477.231	-51797.56	2682987668	1.00	1.004533126
5	4.50	6202168.56	20.25090001	6216204.231	-14035.68	197000182.1	2.00	3.995057528
Σ	12.51	17524657.56	41.28	17524657.56	0.00	15887980312.42	0.00	10.00
\bar{x}	2.50	3504931.51		3504931.51				2.00

ANEXO N° 9.

TABLA N° 9.- Análisis de Varianza ANOVA.

ORIGEN DE VARIANZA	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA CUADRADOS -SC	CUADRADOS MEDIOS -CM	ESTADISTICO F
ENTRE GRUPOS	K-1= 3-1 2	SCE 203497639.30	CME 101748819.65	F=CME/CMD 5.26E-06
DENTRO GRUPOS	N-K=15-3 12	SCD 2.32E+14	CMD 1.93E+13	
TOTAL	N-1=15-1 14	SCT 2.32E+14		

ANEXO N° 10.

TABLA N° 10. Áreas y concentraciones de muestras para porcentaje de recuperación

	MUESTRA SIN FORTIFICAR		MUESTRA FORTIFICADA		% RECUPERACIÓN
	Área	mg/L	Área	mg/L	
1	2461550	1.68	5184295	3.53	113.65%
2	2448070	1.67	5187728	3.53	114.36%
3	2446700	1.67	5233982	3.56	116.34%
\bar{x}		1.67		3.54	114.78%
D.S		0.01		0.02	0.01
C.V%		0.33		0.53	1.22%

ANEXO N° 11.

TABLA N° 11.-Repetibilidad para muestra de vino

REPETIBILIDAD		
	AREA	mg/L
1	2988930	2.04
2	2993049	2.04
3	3056076	2.08
4	3016919	2.05
5	2960194	2.02
6	3185816	2.17
\bar{x}	3033497.33	2.07
D.S	81217.37	0.06
C.V%	2.68	2.68

ANEXO N° 12.

TABLA N° 12.- Contenido de trans-resveratrol contenido en los vinos borgoñas peruanos

MUESTRAS	PRIMERA EXTRACCIÓN	SEGUNDA EXTRACCIÓN		
1	2.03	1.96	\bar{x}	1.99
	1.99	1.97	DS	0.02
	1.98	1.98	C.V%	1.21
2	1.62	1.63	\bar{x}	1.63
	1.65	1.63	DS	0.01
	1.66	1.63	C.V%	0.82
3	2.87	2.89	\bar{x}	2.90
	2.87	2.96	DS	0.05
	2.86	2.97	C.V%	1.74
4	1.74	1.57	\bar{x}	1.66
	1.68	1.59	DS	0.07
	1.72	1.62	C.V%	4.21
5	2.04	2.14	\bar{x}	2.10
	2.15	2.06	DS	0.05
	2.14	2.08	C.V%	2.18
6	2.08	2.06	\bar{x}	2.09
	2.05	2.10	DS	0.04
	2.17	2.06	C.V%	2.09
7	3.33	3.25	\bar{x}	3.27
	3.34	3.25	DS	0.07
	3.30	3.17	C.V%	2.00
8	1.82	1.74	\bar{x}	1.79
	1.83	1.80	DS	0.04
	1.82	1.73	C.V%	2.28

ANEXO N° 13..

TABLA N° 13.- Niveles de trans-resveratrol en vinos tinto borgoña peruanos.

MUESTRAS	NIVEL DE TRANS-RESVERATROL (mg/L)	S.D
Santiago Queirolo	1.99	0.02
Quenta	1.63	0.01
Hacienda del abuelo	2.90	0.05
Reinoso	1.66	0.07
Tabernero	2.10	0.05
Majes tradición	2.09	0.04
Paz soldán	3.27	0.07
Viña vieja	1.79	0.04

ANEXO N° 14..

TABLA N° 14.- Análisis estadístico de t- pareado

	PRIMERA EXTRACCIÓN	SEGUNDA EXTRACCIÓN	Diferencia	
1	2939898.67	2893898.00	46000.67	
2	2411177.67	2389369.67	21808.00	
3	4206522.33	4317552.00	-111029.67	
4	2518949.00	2345758.33	173190.67	
5	3098343.67	3071365.00	26978.67	
6	3086270.33	3042899.33	43371.00	
7	4882238.33	4597438.67	284799.67	
8	2673543.67	2452106.67	221437.00	
			88319.50	\bar{x}
			128321.95	D.S