

Universidad Católica de Santa María

**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotecnológicas**

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



**DETERMINACION DE POLIFENOLES: QUERCETINA, ACIDO CAFEICO,
ACIDO CUMARICO EN VINOS DE LA PROVINCIA DE CASTILLA**

Tesis presentada por el Bach.

Mamani Rojas Abraham Gabriel

para optar el Título Profesional de:

Químico Farmacéutico

Asesor:

PhD. Cárdenas García, Jaime

Arequipa – Perú

2022

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Expediente N°. 20190000034743

N° Trámite en Fac. 1793-2019
Fecha 17-09-2019

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

DE: **MAMANI ROJAS, Abraham Gabriel**

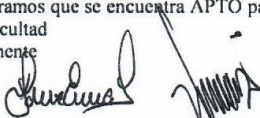
TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

“DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE QUERCETINA, ACIDO CAFEICO Y ACIDO CUMARICO EN VINOS DE LA REGION AREQUIPA”

DICTAMINADORES: 1) Q. F. Juan Ramírez Orellana 2) Dr. Carlos Medina Pomareda

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan de Tesis presentado por la recurrente, se ha procedido a la revisión del trabajo de investigación y hechas las observaciones y sugerencias correspondientes, consideramos que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad
Atentamente

Firmas :



Fecha 25/10/19

ASESOR: Dr. Jaime Cárdenas García

DICTAMEN DE ASESOR:

Se ha procedido a revisar el presente trabajo de investigación y considero que se han cumplido los objetivos propuestos, por lo que el trabajo está apto para su dictámen.

Firma



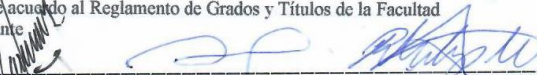
Fecha 30 Nov 2021

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) Mag. Juan Ramírez Orellana
- 2) Mag. Carlos Iván Paz Aliaga
- 3) Dra. Rita Nieto Montesinos

DICTAMEN DE BORRADOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por el recurrente, sugiriendo cambiar el título a: “DETERMINACION DE POLIFENOLES: QUERCETINA, ACIDO CAFEICO Y ACIDO CUMARICO EN VINOS DE LA PROVINCIA DE CASTILLA ”, luego de lo cual y habiéndose cumplido con las correcciones respectivas, consideramos que el presente Trabajo de Investigación se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad
Atentamente

Firma



Fecha 13/10/22

JURADOS: Presidente
Vocal
Secretario

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha:

Hora:

Local: C- 402 (SUM)

DECANO

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres y amigos



AGRADECIMIENTOS

A mi madre y padre que siempre guiaron mis pasos y confiaron en mí

A mis mentores y amigos

*A la universidad Católica de Santa María, la Escuela Profesional de Farmacia y
Bioquímica*

*Al laboratorio de Control de Calidad de Escuela Profesional de Farmacia y
Bioquímica*

*Al Q.F Ricardo Abril, PhD Jaime Cárdenas García, al Ing. Rodrigo Ramos Salas y a la
Q.F. Tiffany Vicent Lozano por hacer este proyecto de tesis posible*

Gracias.

RESUMEN

Se determinó cuantitativamente de los polifenoles en los vinos de la región Arequipa específicamente de Ácido Cafeico, Acido *p*-Cumárico y Quercetina los cuales afectan en gran magnitud en las características organolépticas de los vinos. Las cantidades de Ácido Cafeico, Acido *p*-Cumárico y Quercetina se analizaron en 7 vinos. Para poder determinar la cantidad de estos compuestos fenólicos en el matriz vino se tuvo que realizar una investigación experimental cuantitativa mediante HPLC el cual se tuvo que validar el método a usar para poder afirmar que los resultados obtenidos sean veraces y confiables; entre los parámetros, a usar se tomó en cuenta la linealidad, precisión, exactitud y sensibilidad. Los vinos analizados se elaboraron en casas vitivinícolas sur de la Región Arequipa; principalmente a partir de frutos ricos en flavonoles. Los vinos tintos se elaboraron principalmente a partir de uvas en la provincia de Castilla distrito de Aplao. La cantidad de Ácido Cafeico osciló entre 1.5 - 4.65 mg L⁻¹, el Ácido *p*-Cumárico entre 1.32 – 19.34 mg L⁻¹. Y la cantidad de Quercetina fue de 5.21 – 8.43 mg L⁻¹. Se encontraron niveles inferiores a los presentados en vinos de otras nacionalidades.

PALABRAS CLAVE:

Vino, Ácido Cafeico, Acido *p*-Cumárico, Quercetina y HPLC

ABSTRACT

A quantitative determination was made of the phenolic compounds in the wines of the Arequipa region specifically of Caffeic Acid, Cumaric Acid and Quercetin which were in great magnitude in the organoleptic characteristics of the wines. The amounts of Caffeic Acid, Cumaric Acid and Quercetin were analyzed in 7 grape wines. In order to determine the amount of these phenolic compounds in the wine matrix, a quantifying experimental investigation had to be carried out using HPLC in which the method to be used had to be validated for us to be able to affirm that the results obtained are true and reliable, among the parameters to be used, linearity, precision, accuracy and sensitivity were taken into account. The analyzed wines were made in southern wine-growing houses of the Arequipa Region; Mainly from fruits rich in flavanols. Red wines were made primarily from grapes (types of grapes) at (place of production). The amount of Caffeic Acid between 1.5 - 4.65 mg L⁻¹, Coumaric Acid ranged between 1.32 – 19.34 mg L⁻¹. And the amount of Quercetin was 5.21 – 8.43mg L⁻¹. Levels lower than those used in wines from other nationalities were found.

KEY WORDS:

Wine, Caffeic acid, Cumaric acid, Quercetin and HPLC

ÍNDICE

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I: MARCO TEORICO	4
1.1. Vino: Definición	5
1.2. Historia del Vino	5
1.3. Vino en el Perú	6
1.4. Preparación de Vinos	7
1.4.1. Cosecha o Vendimia	8
1.4.2. Desapillado y Estrujado	8
1.4.3. Encubado	9
1.4.4. Fermentación	10
1.4.5. Descubado	11
1.4.7. Embotellamiento	12
1.5. Composición Química del Vino	13
1.5.1. Compuestos Fenólicos	13
1.5.2. Quercetina	15
1.5.3. Quercetina en Vino	16
1.5.4. Ácido Cafeico	17
1.5.5. Ácido Cafeico en Vino	18
1.5.6. Acido <i>p</i>- Cumarico	20
1.5.7. Acido <i>p</i>-Cumarico en Vino	21
1.6.1. Bases de la Separación	22
1.6.2. Partes del Equipo	23
1.6.2.1. Reservorio de Fases Móviles	23
1.6.2.2. Tuberías	24
1.6.2.3. Uniones	24
1.6.2.4. Bomba	25
1.6.2.4.1. Sistema de Gradientes	25
1.6.2.6. Inyectores	25
1.6.2.7. Columna	27
1.6.2.8. Detectores	27
1.6.2.8.1. Detector UV/VIS	28
1.6.2.8.2. Detector de Fluorescencia	29

1.6.2.8.3. Detector Electroquímico	29
1.6.2.9. Desgasificador.....	30
1.7. Validación del Método Analítico.....	31
1.7.1. Cuando es Necesario una Validación.....	31
1.7.2. Parámetros para validar un método analítico	31
1.7.3. Linealidad	31
1.7.4. Límites de Detección y Límites de Cuantificación	32
1.7.5. Límite de Detección.....	33
1.7.6. Límite de Cuantificación	33
1.7.7. Precisión	33
1.7.8. Exactitud	34
CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS	36
2.1. Materiales.....	37
2.1.1. Equipos de Laboratorio.....	37
2.1.2. Reactivos	37
2.1.3. Materiales.....	38
2.2. Métodos	38
2.2.1. Obtención de la Muestra.....	38
2.2.2. Cromatografía Líquida de Alta Performance	39
2.2.2.1. Condiciones Cromatográficas	39
2.2.2.2. Preparación de la solución stock y diluciones del estándar de Ácido Caféico	39
2.2.2.3. Preparación de la solución stock y diluciones del estándar de Ácido p-Cumarico	39
2.2.2.4. Preparación de la solución stock y diluciones del estándar de Quercetina	40
2.2.2.5. Preparación de la Fase Móvil.....	40
2.2.2.6. Preparación de la muestra.....	41
2.2.2.7. Validación del Método	41
2.2.2.7.1. Linealidad	41
2.2.2.7.2. Límites de Determinación y Cuantificación.....	42
2.2.2.7.3. Precisión	42
2.2.2.7.4. Exactitud	43
2.2.2.8. Muestras	44
CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSION.....	45
3.1. Linealidad	46
3.2. Tiempos de Retención	53
3.3. Límites de Detección y Cuantificación	55
3.4. Precisión.....	57
3.5. Exactitud	60

3.6. Aplicación Analítica	62
CONCLUSIONES	68
REFERENCIAS	69



INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: El Proceso de producción del vino.....	7
Figura 1.2: Despalilladora de uvas	9
Figura 1.3: Equipo de remontado	10
Figura 1.4: Proceso tradicional de descuve	11
Figura 1.5: Proceso tradicional para encorchar	13
Figura 1.6: Acidos Hidroxycinamicos.....	15
Figura 1.7: Estructura de Flavonoles	16
Figura 1.8: Estructura de los Acidos Hidroxycinamicos.....	¡Error! Marcador no definido.18
Figura 1.9: Esquema de un Cromatógrafo Liquido	23
Figura 1.10: Union macho y hembra	24
Figura 1.11: Posiciones del Inyector	26
Figura 3.1: Resusltados de la curva de calibrado del Ácido Caféico	48
Figura 3.2: Resultados de la curva de calibrado del Acido <i>p</i> -Cumarico	49
Figura 3.3: Resultados de la curva de calibrado de Quercetina.....	49
Figura 3.4: Cromatograma para determinar los tiempos de retención	53

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Promedio, Desviación Estandar y Coeficiente de Variacion de las areas bajo la curva para Acido Cafeico	47
Tabla 2: P Promedio, Desviación Estandar y Coeficiente de Variacion de las areas bajo la curva para el ácido <i>p</i> - cumárico	47
Tabla 3: Promedio, Desviación Estandar y Coeficiente de Variacion de las areas bajo la curva para la Quercetina.....	47
Tabla 4: Resultados estadisticos para el Ácido Caféico	51
Tabla 5: Resultados estadisticos para el Ácido <i>p</i> -Cumárico	51
Tabla 6: Resultados estadisticos para Quercetina.....	51
Tabla 7: Tiempos de retención de los analitos	53
Tabla 8: Repeticiones y Desviación estandar relativa para Ácido Caféico.....	57
Tabla 9: Repeticiones y Desviación estándar eelativa para Acido <i>p</i> -Cumárico.....	57
Tabla 10: Repeticiones y Desviación estándar Relativa para Quercetina	58
Tabla 11: Porcentaje de Recuperación para Acido Cafeico	59
Tabla 12: Porcentaje de Recuperación para Acido <i>p</i> -Cumárico.....	59
Tabla 13: Porcentaje de Recuperación para Quercetina	60
Tabla 14: Tabla de Resultados.....	62
Tabla 15: Comparacion de Resultados	63

INTRODUCCIÓN

La industria vitivinícola en el Perú es la encargada de realizar la transformación de la uva en vinos mediante procesos, de forma tecnificada y artesanal (1). Se reconoce ampliamente que los atributos deseables de aroma y sabor del vino solo en raras ocasiones son consecuencia de la presencia de mezclas únicas de muchos compuestos aromáticos (2,3). La diversidad, la sutileza y la complejidad de los sabores son muy valoradas, tanto por los expertos en vino como por los consumidores; de hecho, una gran diversidad evidente entre los vinos blancos y tintos se deriva de matices aromáticos bastante sutiles y perfiles de aroma distintos (3). Los compuestos volátiles del vino proceden de varias fuentes: directamente de la baya de la uva; del metabolismo bacteriano y de levaduras; de la extracción de madera de roble tratada térmicamente; de reacciones químicas durante el almacenamiento; y de reacciones enzimáticas y / o químicas de precursores no volátiles durante el procesamiento, vinificación y / o almacenamiento de la uva. (3,4) Es importante determinar la presencia de estos compuestos, por ser indicadores de la calidad de los productos vitivinícola.

En la actualidad hay varias empresas representativas como Queirolo, Taberner, Tacama y Ocucaje y muchas otras pequeñas empresas que serán el motivo del presente trabajo. Los procesos que intervienen en la producción del vino inician con el cultivo de la vid, acopio de la uva, tratamiento del vino en cubas, embotellado (2). Los problemas que afectan a las industrias vitivinícolas son aquellos relacionados con el control de calidad y los componentes químicos que deberían estar presentes para certificar su legitimidad.

El presente trabajo está estructurado por capítulos, así el primero se encuentra el resumen y la introducción, seguido del capítulo segundo en el que se describe la importancia química y el aporte de los compuestos fenólicos a los vinos y también podremos encontrar las partes de equipo que se utilizara para la determinación de estos compuestos como también los pasos para poder validar el método a usar en Cromatografía Líquida de Alta Performance como sus parámetros. Seguido en el capítulo tercero se detalla el procedimiento y los parámetros del equipo que se usaron y finalmente en el capítulo cuarto podemos ver los resultados, discusión y resultados.

HIPÓTESIS

Los vinos producidos de manera artesanal e industrial contienen Quercetina, Ácido Cafeico y Ácido *p*-Cumárico responsables de la calidad del producto, es posible cuantificar sus niveles utilizando la técnica validada por cromatografía líquida de alta performance.



OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar los polifenoles Quercetina, Ácido Cafeico y Ácido *p*-Cumarico en vinos de la provincia de Castilla-Arequipa por cromatografía líquida de alto performance (HPLC).

Objetivos específicos

- Validar una técnica por cromatografía líquida de alta performance para determinar de manera simultánea de Ácido Cafeico, Acido *p*-Cumárico y Quercetina
- Determinar los niveles de los compuestos fenólicos en estudio por cromatografía líquida de alta performance (HPLC), en vinos de la provincia de Castilla-Arequipa.
- Valorar la importancia de la investigación para cuantificar sustancias de gran interés en los vinos.



CAPITULO I:

CAPÍTULO I

1. Marco Teórico

1.1. Vino: Definición

La definición de vino más acertada es de la Oficina Internacional de la Viña y el Vino, por medio del Código Internacional de Prácticas Enológicas, que menciona que “El vino es, exclusivamente; la bebida resultante de la fermentación alcohólica, completa o parcial, de uvas frescas, estrujadas o no, o de mosto de uva. Su contenido en alcohol adquirido no puede ser inferior a 8,5% vol. (4). Por otro lado, Puig y colaboradores nos indica que el “vino es la bebida resultante de la fermentación alcohólica del fruto de la planta denominada *vitis vinífera L.*, o de su zumo”(5). El diccionario de la RAE nos dice que “El vino es la bebida resultante de la fermentación alcohólica, completa o parcial, de la uva fresca o del mosto (6). Balda refiere que “El vino, en simples palabras, es agua alcoholizada obtenida del extracto completo de la uva: semilla, pulpa y cascara” (7). Todos los conceptos concluyen que el producto “vino” es un fermento exclusivamente del fruto de la vid, llamado uva.

1.2. Historia del Vino

Para conocer el desarrollo histórico cultural del vino debemos tener en cuenta que este proceso ha sido largamente estudiado; por esto se sabe que para su producción se tiene todo un compendio de varias técnicas, las cuales han sido traídas hasta nuestros días por civilizaciones antiguas y muy grandes llegando hasta las más pequeñas y modernas. Todos han aportado algo para que este proceso y el resultado de este producto llamado vino se convierta en una bebida alcohólica de gran trascendencia histórica y también como parte del legado de la civilización humana. Cabe recalcar que el vino no solo es una bebida alcohólica más aun ha sido tomada por grandes civilizaciones como Egipto, Grecia y Roma como símbolo de lujo, poder de la alta sociedad especialmente en los actos políticos y hasta ha sido adorado, con el nombre de “Dionicio o Baco” que fue un dios de los romanos el cual era el que presidía toda la viticultura, el cultivo, recolección y tratamiento de la Vid, así como también el teatro, el éxtasis religioso y la locura ritual (8).

Entre los años 8000 y 6000 AC en las regiones de las ahora llamadas Turquía, Siria e Irán, se dio el crecimiento de las variedades “*Vitis Silvestre*” y también se tiene los primeros registros del consumo de uvas fermentadas.

Entre los años 5400 y 5000 A.C en Irán existieron los primeros registros de la producción de vino, hecho evidenciado por rastros de ácido tartárico en vasijas utilizadas en distintos procesos químicos. Por otro lado, hay que mencionar que hace 4000 años en China ya era conocida la fermentación de la uva. El consumo de vino ha acompañado a diferentes civilizaciones por milenios de años y de esta forma su consumo se ha hecho habitual.

1.3. Vino en el Perú

Cuando los españoles llegaron al Perú, vieron que los valles costeros eran muy productivos para la siembra y cosecha de la vid. La tierra y el clima eran los propicios para su adaptación, con ello el cultivo correcto por los nuevos migrantes europeos. En específico la costa peruana fue la principal fuente de vid en el siglo XV, cuando el Perú era el centro de poder del Virreinato. Lima y sus alrededores eran las principales zonas de producción, porque ahí se encontraba toda la burocracia administrativa, y la necesidad del consumo del vino era muy alto (1).

El vino en el Perú se vio fuertemente impulsado en dos puntos importantes; uno era Lima, que en ese entonces era una capital muy rica, y era la principal capital europea en América Latina; por lo tanto, se centralizaba el poder administrativo, económico y social. Por otra parte, estaba Potosí (Bolivia) que a la época era un gran polo de alta producción minera (1).

El centro minero de Potosí fue uno de los más grandes impulsores de la viticultura del Perú, por lo que logró incrementar masivamente la producción de uva en los valles de Moquegua, Ica y Pisco, lugares donde en el siglo XVII se elaboraron 13 millones de litros de vino dirigidas al mercado. Lo más característico en la producción de los vinos en estas regiones, fue que todo el proceso del vino; se realizaba en recipientes de barro cocido, conocidos como botijas y tinajas, convirtiéndose en actividades productivas artesanales. Por esta razón se conocía al vino como el mejor de toda América en los años XVII (1). El comienzo de la producción de vino en el Perú se da a toda marcha con las distintas y amplias bodegas y viñedos que se extendían por todo el país; paralelamente a la producción de vinos también se tiene al aguardiente (1).

1.4. Preparación de Vinos

La historia cultural de la preparación de los vinos desde que esta se creó, ha sido modificada de diversas maneras conforme a que la preparación de este producto no ha sido igual. Así se tratara de usar un esquema el cual se utilizara para explicar mucho mejor su elaboración (9). En la figura 1.1 explica el proceso de la preparación de vinos.



Figura 1.1: El proceso de producción de vino tinto

1.4.1. Cosecha o Vendimia

Para una buena vinificación de la uva se debe de pasar por ciertos análisis tanto sensoriales donde por un examen visual se determina el color de las bayas que debería ser sui generis para cada tipo de uva, el tono de la piel que se mide aplicando resistencia mecánica a la piel de la baya, esta no debería de romperse. Por otro lado, están los ensayos fisicoquímicos donde se determina el contenido de azúcar en las bayas para lo cual se usan los métodos como la determinación del índice de refracción, el método de Fehling para la determinación de los azúcares reductores (10).

Se cosecha las uvas y se almacenan en un recipiente; el peso no debe ser mayor a 15 Kg para evitar el daño de las uvas (10)

1.4.2. Desapillado y Estrujado

Habiendo recibido la cosecha o vendimia, esta lleva consigo con otros elementos como hojas, raíces, tallos o raspón, los cuales se deben de evitar en este proceso puesto, que afectan directamente el sabor del producto final, a esto se le conoce como desapillado. Este proceso se da en un desapillador que es una maquina la cual gira y por unos orificios internos separa las bayas de los tallos (11).

La desapilladora también da un estrujado leve a las uvas desapilladas el cual sirve para el derrame del primer zumo de la uva y el contacto de las levaduras de la piel de la uva con el zumo obtenido (12).

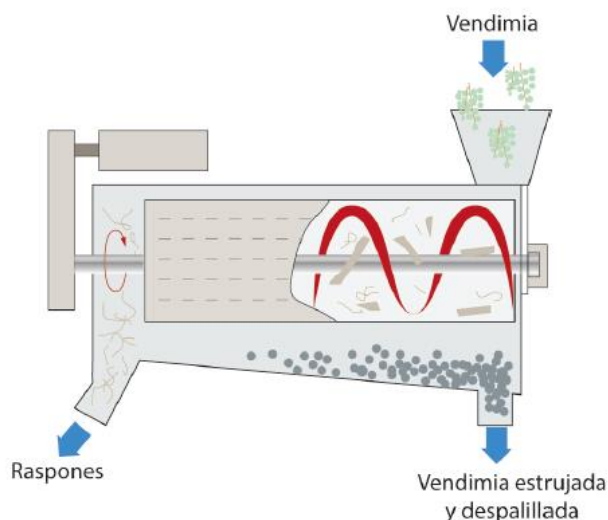


Figura 1.2: Despalilladora

En la figura 1.2 muestra una despalilladora en la cual la producto ingresa por la parte superior, pasa por el cilindro, separa las bayas de los tallos o raspones y da un estrujado final; proceso necesario para el inicio de la vinificación.

1.4.3. Encubado

En esta parte del proceso se da el llenado de los depósitos de fermentación con el mosto ya despalillado. Este proceso se realiza con la función de mantener el mosto que será fermentado en un ambiente estéril ya que los depósitos son de acero inoxidable lo que a su vez permite la salida de gases producto de la fermentación (11). También es característico la aplicación de metasulfito de potasio el cual al ser añadido pasa a convertirse en anhídrido sulfuroso (10). Este proceso de añadido también conocido como sulfitado es importante porque tiene función antiséptica y ocasiona una mejora en las características organolépticas.

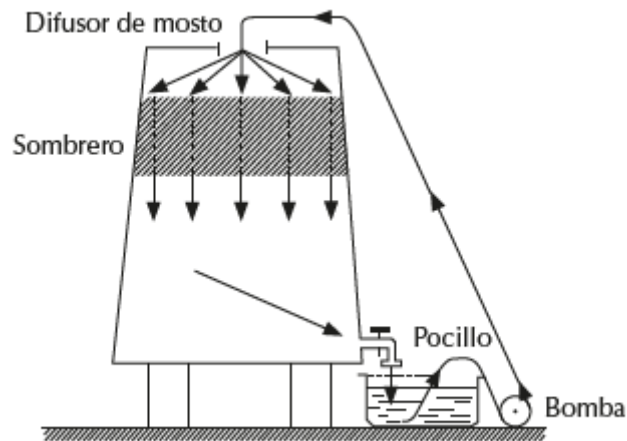


Figura 1.3: Equipo de Remontado

Es importante conocer este proceso puesto que conlleva un proceso de fermentación y por ende formación de los gases (12). Los residuos del mosto como raíces, pieles comienzan a formar una capa sólida conocida como sombrero el cual sería empujado hacia la superficie del depósito, al estar expuesto al oxígeno este se vería inmerso en una fermentación más fuerte y se formaría una solución más heterogénea lo que no sería beneficioso para el posterior sabor del vino. La solución es el “remontado” término que se atribuye a la inmersión del sombrero por el jugo el cual será empujado por bombas que como se muestra en la figura 1.3, en otro caso podría empujarse el sombrero por paletas manualmente (11).

1.4.4. Fermentación

Es importante saber también que el vino al ser un producto fermentado y es capaz de cultivar una serie de bacterias y levaduras por el hecho de que en procesos anteriores se mezcló el jugo con las pieles y los tallos, pero al ya haber pasado por la fermentación el jugo ya posee etanol y el añadido de Sulfatos lo cual mantiene a todas las especies microbiológicas en niveles que no sean perjudiciales para la salud ni para las características organolépticas del propio vino (13).

Según Bujan “Proceso en el que la glucosa es transformada por un microorganismo en etanol y en una serie de productos con cualidades sensoriales y con desprendimiento de gas carbónico y de calor”, este proceso es consecutivo al encubado de formación del etanol por las bacterias presentes en las bayas, raíces y demás partes del vino, se conoce que la bacteria *Saccharomyces Cerevisiae* es la principal creadora de etanol en vinos (12).

Esta etapa se produce en aproximadamente 15 días a una temperatura aproximada entre 20 a 28°C. Como se mencionó antes el sombrero que se forma debe de ser cubierto con el jugo, ya que se debe de evitar toda costa las bacterias acéticas las cuales usan el azúcar para convertirlo en ácido acético lo cual malogra el sabor del vino por completo, estas bacterias acéticas son proveídas por unas moscas de algunas conocidas serían las *Drosophila melanogaster* (14).

1.4.5. Descubado

Al momento que se detiene la fermentación se procede a realizar la separación de los sólidos del vino para que pase a una fermentación lenta y se termine de consumir los azúcares del vino (14).



Figura 1.4: Proceso tradicional de descube

En la figura 1.4 podemos ver el descube tradicional donde se separa el vino de los sólidos del vino por la parte inferior.

1.4.6. Fermentación Maloláctica

En el vino está presente un ácido muy importante que es el ácido málico el cual al igual que los azúcares en la fermentación es usado por las bacterias para producir ácido láctico, produciendo a su vez CO₂ (12).

La fermentación maloláctica es producida por un numero de bacterias, pero la principal es *Oenococcus oeni*. El ácido málico aporta un sabor áspero y fuerte al vino final así que las bacterias al usarlo en sus procesos bioquímicos reducen este gusto (13) , modificando el sabor así de uno áspero y agresivo por uno más delicado y con un cierto toque dulce producido por el ácido láctico (12).

Al convertir el ácido málico en láctico un ácido con un pka mayor tiende a subir el pH lo cual a las antocianinas que son moléculas que proveen al vino de su color característico mejoran esta característica reduciendo el color rojo (13).

1.4.7. Embotellamiento

Después de esperar la fermentación maloláctica es necesario pasar el vino al envase que será el envase de este por muchos años para esperar su añejamiento como también para su distribución inmediata, dependiendo de lo que se busque (12).

El primer paso a seguir es el llenado del vino en la botella y se dejara casi inalterable la botella con el fin de que se evite el movimiento, este procedimiento se realiza con el fin de comprobar que sea una solución heterogénea, de no ser así produciría un sedimento en el fondo de la botella, esto sería perjudicial para la conservación futura, el sabor y la presentación del vino (14).

Posteriormente si pasó la prueba del sedimento se pasa al acorchamiento, podemos observar en la figura 1.5 una manera tradicional de encorchar las botellas de vino.



Figura 1.5: Proceso tradicional para encorchar

1.5. Composición Química del Vino

1.5.1. Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos son una familia amplia y heterogénea de sustancias responsables de gran parte de los atributos sensoriales del vino tinto, como el color, la sensación en boca, la astringencia y el amargor (15,16). Los compuestos fenólicos se suelen clasificar en dos amplias familias: los no flavonoides, que incluyen principalmente estilbenos, ácidos hidroxicinámicos y sus ésteres; y los flavonoides, que incluyen flavonoles, antocianinas y flavonoides (16). Los estilbenos no tienen un efecto directo sobre los atributos sensoriales del vino, pero son de interés por sus propiedades saludables como prevención de enfermedades coronarias y se ha demostrado que tiene actividad en contra de algunos tipos de cánceres como la leucemia, es el caso de un metabolito producido por el resveratrol (16). Los ácidos Hidroxicinámicos tales como Ácido Caféico, Ácido Cinámico, Ácido *p*-Cumarico representados en la figura 1.5 y sus ésteres no juegan un papel directo en el color del vino, pero pueden actuar como copigmentos

(17). También se ha descrito que la presencia de los compuestos fenólicos contribuye al amargor del vino, en un estudio donde se planteó esta característica a personas y se encontró que presentaba Ácidos Hidroxicinámicos (18).

Los flavonoles están presentes en los hollejos de las uvas y son los responsables del color amarillo de las uvas blancas. Algunos de los flavonoles se liberan de los hollejos durante las operaciones de vinificación, contribuyendo así al color amarillo de los vinos blancos y al componente amarillo del color de los vinos tintos (18,19). También se ha informado que los flavonoles pueden contribuir al color rojo del vino como copigmentos y al amargor (17,19).

Las antocianinas solo están presentes en los hollejos de las uvas tintas y son las responsables de su color rojo violáceo. Se liberan en el mosto durante el proceso de maceración, confiriendo así un color rojo al vino. Sin embargo, el color del vino también depende del pH del vino y de la presencia de cofactores de copigmentación, principalmente flavan-3-oles monoméricos, flavonoles y ácidos hidroxicinámicos, que evitan la hidratación de las antocianinas y, por lo tanto, mejoran la intensidad del color (20).

El grupo de los flavonoles incluye flavan-3-oles monoméricos y sus polímeros, también conocidos como taninos condensados o proantocianidinas. Las proantocianidinas contribuyen a la estabilidad del color a largo plazo al combinarse con las antocianinas (21). También se asocian con el amargor y ciertas sensaciones de textura como el cuerpo y la astringencia (22).

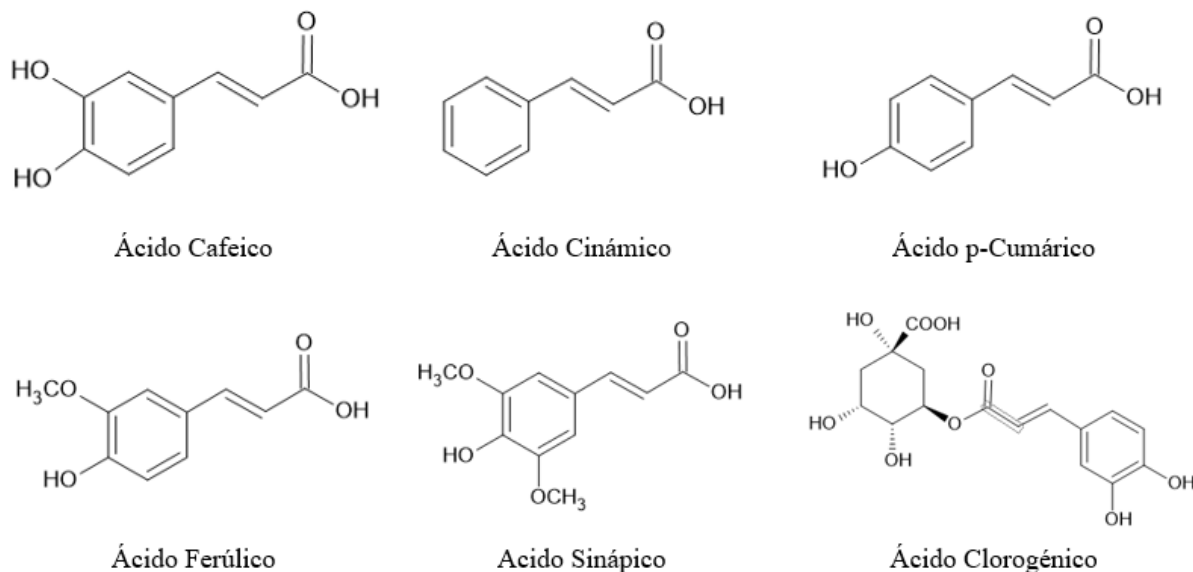


Figura 1.6: Ácidos Hidroxicinámicos

1.5.2. Quercetina

Quercetina es un compuesto fenólico específicamente un flavonol el cual se caracteriza por presentar la estructura básica que se presenta en la figura 1.6. Además, presenta un grupo hidroxilo (OH) en el radical R1 y un hidrogeno (H) en el radical R2.

La quercetina presenta importantes beneficios relacionados con el corazón como inhibición de la oxidación de LDL, efectos vasodilatadores independientes del endotelio, reducción de moléculas de adhesión y otros marcadores inflamatorios, efecto protector contra el óxido nítrico y la función endotelial en condiciones de estrés oxidativo, prevención del daño oxidativo e inflamatorio neuronal y efectos antiagregantes plaquetarios (23). El papel de la Quercetina y sus derivados puede ir más allá de su existencia en los alimentos y tiene potencial como molécula líder en los programas de desarrollo de fármacos (24).

La promoción de la vaso relajación endotelial y la reducción del riesgo de cáncer (23,25). El resveratrol y la Quercetina son activadores indirectos del receptor hidrocarburo arilico, es de real importancia puesto que la activación de estos receptores es esencial para el desarrollo de los mamíferos (26).

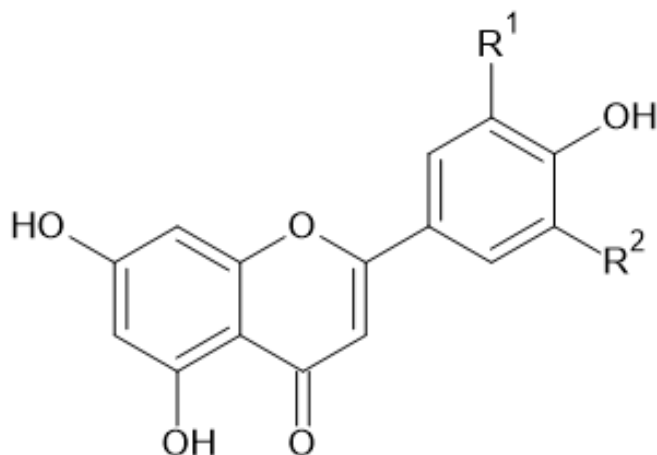


Figura 1.7: Estructura de los Flavonoles

1.5.3. Quercetina en Vino

Los flavonoles, como la Quercetina, tienen propiedades de captura de radicales libres y; por lo tanto, se consideran antioxidantes de la dieta. De tal modo que, estos compuestos son importantes para la producción de vino; por lo que, pueden utilizarse para controlar la calidad del vino tinto mediante el análisis cuantitativo del contenido de flavonoides (27). La calidad de la fruta, que se manifiesta por características sensoriales como el color, la textura y el sabor, está determinada en gran medida por un número limitado de compuestos flavonoides, que son metabolitos secundarios de las plantas. Los flavonoides, así como otros fenoles y compuestos relacionados, también se encuentran en productos terminados como el vino. Son en parte responsables del color, la fragancia y, en cierta medida, del sabor y, por tanto, de la calidad del vino. Además, se atribuyen efectos positivos para la salud a algunos flavonoides (17).

1.5.4. Quercetina en la Salud

Quercetina ha sido estudiada ampliamente por sus beneficios a la salud entre los principales aportes a esta podemos encontrar efectos antioxidantes, potencial efecto anticancerígeno, antiinflamatorio entre otros.

La quercetina ha sido estudiada también en el ámbito neurológico específicamente por su efecto protector contra la enfermedad neurodegenerativas, donde se encontró que la quercetina logro modular el estrés oxidativo que se producía a nivel neuronal pudiendo así ser un neuroprotector (28).

El estudio de la quercetina como agente anticancerígeno ha sido probada por Jeong et al, donde demuestran que la quercetina puede inhibir las células cancerígenas previniendo la liberación de un factor transcripcional necesario para a síntesis de ADN de las células cancerígenas (29).

Un efecto antioxidante de la quercetina, demostró que la quercetina trabaja como un agente anti-diabético ya que su objetivo es la hiperglicemia y el estrés oxidativo, esto se vio reflejado en la reducción de niveles de azúcar en ayunas (30).

1.5.5. Ácido Cafeico

Ácido Cafeico tiene la estructura base de los ácidos hidroxicinámico el cual se presenta en la figura 1.7 donde en el radical R1 es un grupo Hidroxilo (OH), y el radical R2 es un hidrogeno (H) y el R3 es un hidrogeno (H) completando el ácido carboxílico en el radical R3.

El Ácido Caféico es el principal ácido hidroxicinámico y pertenece a la familia de polifenoles del ácido fenólico. Contiene grupos funcionales fenólicos y acrílicos, los cuales están presentes en la dieta humana, con mayor contenido en frutas, vegetales, té y vinos (31). Además ha sido altamente usado como base para la creación de nuevos productos químicos con potencial interés terapéutico asociado al estrés oxidativo (32) . El Ácido Caféico se ha empleado en gran medida como una estrategia alternativa para combatir la patogénesis microbiana y la infección crónica inducida por microbios como

bacterias, hongos y virus (33). El Ácido Caféico ejerce un efecto estabilizador del color y resistente a la oxidación (34).

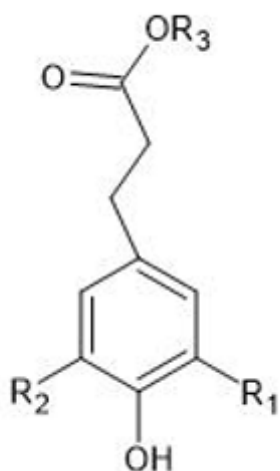


Figura 1.8: Estructura de los Ácidos Hidroxicinámicos

1.5.6. Ácido Cafeico en Vino

El color de un vino tinto es el resultado de los componentes de la uva presentes, las técnicas de elaboración del vino y los procedimientos de estabilización y envejecimiento empleados. Las antocianinas son en gran parte responsables del color de los tintos jóvenes, jugando un papel fundamental a pesar de que su reactividad hace que se desvanezcan durante la crianza. La asociación entre antocianinas y flavonoides se conoce como “pigmentos poliméricos” (35,36), la concentración de estos compuestos poliméricos es mayor cuando son madurados (36), por otra parte se ha demostrado que al añadir Ácido Caféico en parte de la pre-fermentación del vino muestra un mejoramiento en el color del 60%, esto se explica porque el Ácido Caféico permite que se puedan disolver más pigmentos y por la copigmentación que estos permiten con las antocianinas se mejore el color final del vino (37).

En las soluciones de agua y alcohol, como en el vino, las antocianinas existen en diferentes formas en equilibrio, condicionadas por su pH. De estos, solo los cationes de flavilio que predominan a pH muy ácido son de color rojo (35,37); por lo tanto, al pH del vino (3.2-4.0) la mayoría de las antocianinas se encuentran en sus formas incoloras o de color tenue. Un proceso que puede ser de gran importancia y que contrarresta el efecto negativo de la acidez relativamente baja del vino es la copigmentación, que contribuye a la extracción y conservación del color rojo en vinos tintos jóvenes donde las antocianinas siguen siendo en gran parte responsables del color, sirviendo quizás como un primer paso en la formación de pigmentos más estables en el tiempo durante la crianza del vino (37).

Como ya se mencionó, estos fenómenos de copigmentación se han estudiado ampliamente en soluciones de modelos para determinar la influencia de factores como el pH, la temperatura, el contenido de alcohol y las relaciones molares copigmento-pigmento sobre la magnitud y extensión de la copigmentación. Un ejemplo de estos efectos sería que cuando la temperatura o contenido de alcohol disminuye el efecto de copigmentación y aumenta la relación molar copigmento-pigmento. (18) El copigmento, normalmente un compuesto orgánico incoloro, se asocia predominantemente con las formas coloreadas de las antocianinas, desplazando sus equilibrios hacia formas coloreadas del catión flavilio. Esto aumenta la intensidad del color (efecto hiperocrómico), produciendo un desplazamiento de la longitud de onda a la que se produce la máxima absorbancia (efecto batocrómico) (18).

1.5.7. Ácido Cafeico en la Salud

El Ácido Caféico es conocido por tener muchos beneficios a la salud entre los que se pueden destacar efectos anticancerígenos, antiinflamatorios entre otros. Por otra parte, también es conocido por tener una buena capacidad antioxidante lo que sería beneficioso contra los radicales libres que podrían producir estrés oxidativo en nuestras células.

Kanimozhi y Prasad describen el efecto inhibitorio del Ácido Caféico en la proliferación de las células cancerígenas; en su trabajo se describe los efectos anticancerígenos el Ácido Caféico donde se demuestra que fue usado también para el hepatocarcinoma, carcinoma pulmonar, carcinoma prostático, melanoma (38) .

Feng et al, demostraron que el uso de Ácido Caféico tiene efecto hipoglucemiante, reduciendo la elevación de la glucosa en sangre, incrementando el uso de la glucosa para su conversión en adipocitos, por lo que el beneficio del consumo de Ácido Caféico sería el de reducir la glucosa en sangre favoreciendo su utilización reduciendo así su nivel en sangre (39).

Los compuestos fenólicos son conocidos por su capacidad antioxidante, específicamente su capacidad para donar hidrógenos de su estructura a los radicales libres estabilizándolos y así deteniendo la cadena de propagación durante los procesos de oxidación (40).

1.5.8. Acido *p*- Cumarico

Ácido *p*-cumárico posee la estructura base de los ácidos hidroxicinámico esta estructura se presenta en la figura 1.7 donde el radical R1 es un hidrogeno (H), el radical R2 es un hidrogeno (H) y el R3 un hidrogeno (H).

El ácido *p*-cumárico (ácido 4-hidroxicinámico) es un ácido fenólico que tiene baja toxicidad en ratones (LD50 = 2850 mg/kg de peso corporal), sirve como precursor de otros compuestos fenólicos y existe en forma libre o conjugada en plantas. Los conjugados de ácido *p*-cumárico se han estudiado ampliamente en los últimos años debido a sus bioactividades, es el caso de los estudios de su capacidad antioxidante la cual se realizó con la prueba del DPPH, esta prueba mide la capacidad antioxidante a partir de una reacción de óxido-reducción. Los resultados de esta prueba demostraron un baja capacidad antioxidante, pero también se señaló que en el sistema alimentario y en las células puede ejercer una capacidad antioxidante similar a la del Ácido Caféico (41).

Existe evidencia de los amplios beneficios que el ácido *p*-Cumarico. Kehan pei en su revisión nos describe ampliamente las actividades biológicas y propiedades farmacocinéticas como también la biodisponibilidad y bioaccesibilidad del ácido *p*-cumárico y sus conjugados con mono, oligo y polisacáridos, alcoholes alquílicos, ácidos orgánicos, amina y lignina (41). Se comparan sus actividades biológicas, incluidas las actividades antioxidantes, anticancerígenas, antimicrobianas, antiviral, antiinflamatorias, antiagregantes plaquetarias, ansiolíticas, antipiréticas, analgésicas y antiartritis, y sus efectos mitigadores contra la diabetes, obesidad, hiperlipemia y gota (41).

1.5.9. Ácido *p*-Cumarico en Vino

En las uvas, el ácido *p*-cumárico es un precursor de polifenoles, especialmente para flavonoides, flavonas y flavonoles. Este ácido es igualmente un sustrato crucial para que las bacterias como la *Saccharomyces cerevisiae*, capaz de fermentar azúcares en alcohol en vinos, pueda producir resveratrol que es conocida por su gran capacidad antioxidante (42). Se sabe que este ácido es muy inestable en los experimentos de análisis y fermentación (43). Durante la fermentación, se libera ácido *p*-cumárico debido a las bacterias lácticas presentes en el vino, que son capaces de producir fenoles volátiles estimuladas por los ácidos hidroxicinámicos, ejemplo de esto es que el Ácido Caféico y el ácido ferúlico inducen a la síntesis de una enzima dentro del metabolismo de Ácido *p*-Cumarico (44).

1.5.10. Ácido *p*-Cumarico en la Salud

El ácido *p*-cumarico derivado del ácido cinámico comúnmente se encuentra en tres isómeros, entre estos el más común es el que está en posición “para”, se encuentra en varias plantas y en el vino. Ha sido estudiado por su capacidad de mejorar la salud humana, por su capacidad antioxidante.

Akdemir en su trabajo concluyo que el uso de ácido *p*-cumarico protege al hígado y a los riñones ante el daño producido por CIS platino, los beneficios producidos se los atribuyeron a la capacidad antioxidante que este posee (45).

Por otra parte, se ha descubierto que el ácido *p*-cumarico reduce las citoquinas pro inflamatorias en las vías respiratorias y los pulmones, pudiendo ayudar a personas con daño pulmonar agudo donde la inflamación es un factor clave en el tratamiento de esta enfermedad (46).

1.6. Cromatografía Líquida de Alta Performance

La cromatografía es un método usada para la separación de varios compuestos de una muestra, se hace de acuerdo a la afinidad de estos compuestos a una fase estacionaria por la cual transcurre una fase móvil (47). En este tipo de cromatografía se usa solventes líquidos como fase móvil. Según la autora Andrea Weston, la cromatografía es un método en el cual los componentes de una mezcla son separados en una columna adsorbente en un sistema de flujo (48).

Parte importante de la cromatografía son la fase móvil y la fase estacionaria, la primera según la IUPAC es un fluido el cual percola o se mueve por un medio poroso y este puede ser de tres tipos líquido, gas y fluido supercrítico (49).

El nombre de la cromatografía es provisto por la naturaleza de la fase móvil usada. Por ejemplo si se usa un líquido será conocida como Cromatografía líquida (49); por otro lado está la fase estacionaria que es un material sólido adsorbente.

High Performance liquid Chromatography o Cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) es un término usado para referirse a la cromatografía líquida, pero en esta la fase móvil está siendo impulsada por una bomba la cual puede ser graduada y en este mismo también puede ser usadas distintas fases móviles (48).

1.6.1. Bases de la Separación

Las bases del porque se puede separar los compuestos de una matriz se ven desde el punto de la muestra que al entrar en contacto con la fase estacionaria comienzan a haber interacciones entre estos como puentes de hidrogeno, hidrofóbicas, hidrofílicas, dipolares, electrostáticas, entre otras. Por lo tanto, la interacción más fuerte entre la fase móvil o la fase estacionaria y el compuesto químico provocara que los compuestos de la muestra tengan eluciones distintas dependiendo del grado de afinidad que tengan por

estas, dando como resultado tiempo de elución distintos por cada compuesto químico (47).

1.6.2. Partes del Equipo

En la figura 1.9 podemos observar un equipo HPLC con todas sus partes importantes, todas en conjunto funcionan para generar resultados veraces.

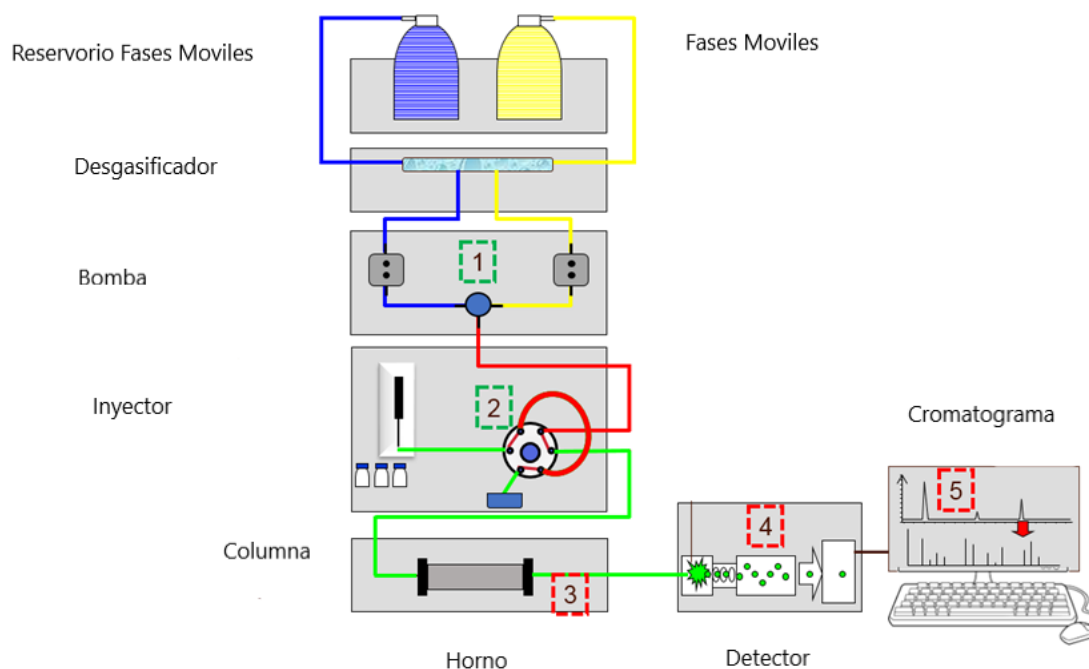


Figura 1.9: Esquema de un Cromatógrafo Líquido

1.6.2.1. Reservorio de Fases Móviles

Es el recipiente en el cual se conservan las fases móviles para mantenerlas fuera del alcance del polvo que pueda entrar al equipo. Comúnmente se coloca unos centímetros sobre la bomba para que la fuerza de gravedad ayude a su desplazamiento. Hay que tener en cuenta que tiene que estar en muy buen estado fuera de eso puede ser de vidrio o de algún polímero resistente y debe de tener una tapa para el aislamiento del medio ambiente porque puede ser contaminado (47).

1.6.2.2. Tuberías

Es importante que las tuberías del sistema sean inertes, para evitar algún tipo de interacción con la fase móvil o con la muestra y dependiente de su ubicación ser resistentes a la presión alta. Entre los materiales más usados son el teflón y el acero inoxidable, siendo este último usado en las partes del HPLC donde hay más presión como la columna, el inyector entre otros (47)

1.6.2.3. Uniones

Las uniones principalmente son hechas para la conexión de tuberías y con estas al sistema cromatográfico. Principalmente se componen de la unión de una pieza “macho” la cual tiene una parte que une y afirma la pieza y la “hembra” donde se ajusta la pieza macho. Las uniones deben de ser:

- Inertes a las fases móviles y a las muestras
- Deben de cerrar herméticamente
- No deben de contribuir al ensanchamiento de banda extra columnar por la presencia de puntos muertos.

En la figura 1.10 podemos observar una unión entre una pieza macho y una hembra donde la pieza ubicada en la izquierda de la imagen es la macho que encaja en la hembra y puede ajustar de tal manera que pueda evitar fugas (47).

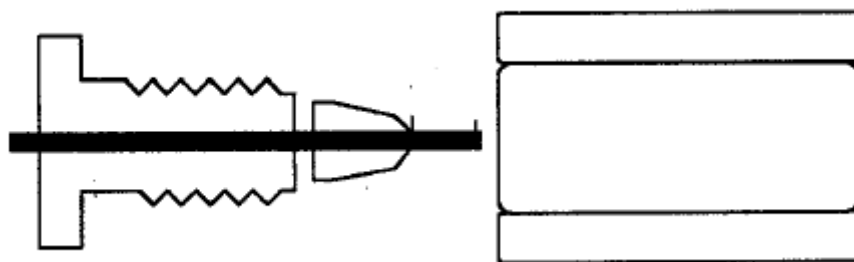


Figura 1.10: Unión macho y hembra

1.6.2.4. Bomba

Las bombas son las encargadas de impulsar la fase móvil por todo el sistema del HPLC desde los reservorios hasta la columna, por lo que deben de mantener presiones constantes sin interrupciones. Las bombas deben de ser fáciles de purgar, confiables y fáciles de mantener y deben de ser resistentes a la corrosión (48).

Las bombas al estar hechas de acero inoxidable son capaces de soportar el desgaste químico propio de la fase móvil usada que puede ser acidificada, como también el desgaste mecánico propio de las presiones que se maneja como del flujo constante de las fases móviles que transitan por el interior del equipo (47).

El caudal o flujo de las bombas pueden operar entre 0.1 a 10 mL por minuto y llegar a presiones de 6000 psi o 413.6854 bar (47).

1.6.2.4.1. Sistema de Gradientes

Las gradientes de concentración son un sistema capaz de regular y variar la composición de la fase móvil en un contenido porcentual. Como por ejemplo comenzar con una composición de metanol agua 90:10 y luego pasar a metanol agua 10:90 al cual se le denominara gradiente, por otro lado, se tiene la opción de usar una sola proporción de fase móvil como por ejemplo metanol agua 10:90 este se conocerá como isocrática (47).

1.6.2.6. Inyectores

Es el dispositivo capaz de introducir la muestra en solución al sistema sin interrumpir el caudal. El inyector debe de ser:

- Fácil de Operar
- Inerte al ataque químico y debe de soportar presiones altas.
- Preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida al sistema.
- No debe de producir diluciones

Existen dos tipos de inyectores que son los automáticos y los manuales, el uso de uno u el otro se basa en el uso que vaya a tener con el equipo, su confianza y el grado de automatización que se requiera (48). Es importante recalcar que los equipos automáticos siempre serán mucho más confiables y precisos que los manuales ya que no dependen de la habilidad del operador (47).

El volumen del inyector puede variar desde 0.5uL a 5mL dependiendo del tamaño del inyector (48).

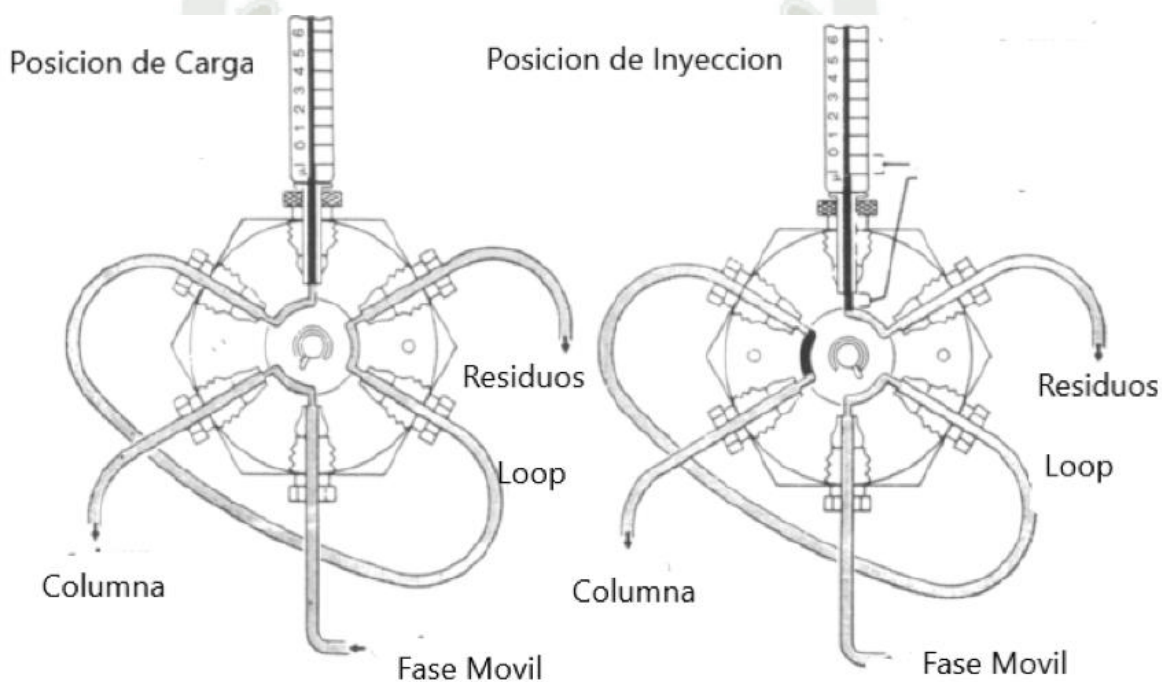


Figura 1.11: Posiciones del inyector

Existen dos posiciones del equipo que son de carga y la de inyección, el primer momento se obtiene la muestra de los viales y se carga en una jeringa y se coloca el rotor del inyector en posición de carga como podemos observar en la figura 1.11, donde la muestra extraída se coloca en el loop de muestra y posteriormente gira el rotor a posición de inyección donde deja pasar la fase móvil por el loop donde se depositó la muestra y se transporta a la columna y así se evita que la fase móvil se detenga.

1.6.2.7. Columna

Las columnas de cromatografía también llamadas fases estacionarias son usadas para separar moléculas en solución en base a su hidrofobicidad (48), existen varios tipos de cromatografía líquida que se van dependiendo a la columna que se utilice:

- **Cromatografía Líquida Fase Normal**
Es la primera forma de cromatografía líquida que se creó, para este caso la columna o fase estacionaria era en base a sílice o alúmina y una fase móvil de hidrocarburos como éter de petróleo o cloroformo; con el tiempo ha dejado de ser muy utilizada y opacada por la cromatografía líquida en fase reversa (50).
Según Quattrochi la cromatografía líquida fase normal se realiza sobre fases estacionarias apolares y por otro lado sus fases móviles de mediana o baja polaridad, su mayor problema a la actividad entre la fase estacionaria que tiende a absorber agua y solvente polares lo que ocasiona problemas al momento de comprobar la reproducibilidad de los métodos (47).
- **Cromatografía Líquida Fase Reversa**
Es el tipo de cromatografía líquida más usada, su nombre se debe a que la cromatografía tradicional utilizaba como fase estacionaria compuestos polares en cambio en este tipo de cromatografía se utilizan compuestos apolares compuestos, comúnmente unidos a la sílica por lo que también se le conoce como cromatografía de fase ligada (48). Las columnas de fase reversa más utilizadas son el tipo carbono que se les une a una cadena carbonada que puede ir desde 1 hasta 18 carbonos denominando a esas columnas C1 o C18 según corresponda.

1.6.2.8. Detectores

Según Quattrochi :” El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite ver y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente” (47), por otro lado Andrea Weston considera que “ El detector convierte un cambio en el efluente de la columna en una señal eléctrica que es reconocida por el sistema de información (48).

El detector debe de cumplir con algunos requisitos, como:

- **Respuesta lineal:** Deberá de leer y registrar alguna propiedad del analito que se incremente de manera lineal al aumentar su concentración. Es llamado rango lineal.
- **Responder a todos los solutos:** Es necesario que el HPLC pueda determinar una alta gama de solutos para poder trabajar con muchas muestras, pero comúnmente es difícil ya que se trata de leer una propiedad la cual está entre un líquido que es la fase móvil y un sólido que es el analito.
- **Tener sensibilidad apropiada:** Comúnmente esta propiedad va en contraposición de la universalidad de los solutos, porque al poder detectar varios solutos pierde sensibilidad y al contrario si tiene una alta sensibilidad no puede tener una respuesta correcta a todos los solutos.
- **No afectarse por cambios de temperatura:** Es importante que los cambios de temperatura no varíen la señal emitida y detectada para así tener una lectura correcta.
- **Sistema de Procesamiento de Datos:** Los resultados esperados por el equipo no solo son los componentes separados, más aun es el grafico cromatográfico del cual se deberán sacar los resultados listos para analizar por el especialista a cargo (47).

Existen varios tipos de detectores, cada uno se utiliza con un fin distinto, entre los más resaltantes podemos encontrar:

1.6.2.8.1. Detector UV/VIS

Son detectores capaces de responder solo a sustancias que puedan absorber radiación emitida por una fuente de luz a una longitud de onda específica, estos detectores pueden medir entre rangos de longitud de onda desde 190 a 350nm, y se les llamara Ultravioleta (UV); otros de 350 a 700nm denominados Visible (VIS) y existen detectores que pueden ocupar desde 170 a 700nm denominados UV/VIS. (48).

La función de este detector es la de monitorizar la luz que pasa a través del flujo provisto por el equipo HPLC. Cuando el compuesto de interés este disuelto en el flujo del equipo y llegue al detector este emitirá un haz de luz el cual será absorbido

por el analito evitando así que toda la luz pase al sensor, esta reducción de la luz es interpretado por el sistema y nos da el resultado en valores numéricos (48).

Estos detectores son de dos tipos:

- Detector de onda Fijo
Este detector puede operar a longitudes de onda fijas ya determinadas antes de empezar con el uso del equipo.
- Detector de onda Variable
También conocida como espectrofotométrico, el detector de onda variable permite seleccionar libremente la longitud de onda de trabajo, para esto existe(47).

Con el uso de los detectores Detector de arreglo de (PDA) o Detector de Arreglo de Diodos (DAD), se puede trabajar con todo el espectro y así poder determinar el área de trabajo correcta, también se sabe que los mejores detectores son los PDA puesto a que son muy sensibles en sus mediciones y por su larga vida de uso (48).

1.6.2.8.2. Detector de Fluorescencia

Estos detectores son usados para poder determinar sustancias que emitan alguna fluorescencia natural o conferida otorgada por una derivatización que es un proceso previo a la lectura por HPLC el cual confiere alguna característica la cual pueda ser medida. Este detector al ser sensible y selectivo es el principal para la determinación de trazas (47).

La sensibilidad del detector puede aumentar trabajando con un alto poder de excitación para así poder mejorar la señal recibida, para esto el uso de láser para estimular la excitación de la molécula ha sido mejor distribuido en estos tipos de detectores (48).

1.6.2.8.3. Detector Electroquímico

Según Quattrocchi es el detector más sensible, se considera unas mil veces más sensible que un detector UV y altamente selectivo. Este último parámetro se le

reconoce ya que aparte de determinar compuestos capaces de ser oxidados y reducidos, puede reducir este número colocando un potencial exacto (47).

Los detectores electroquímicos funcionan a partir de la aplicación de un voltaje a través de unos electrodos en una celda, estos responden a sustancias que pueden oxidarse o reducirse (48).

1.6.2.9. Desgasificador

Uno de los parámetros más importantes a tener en cuenta cuando se trabaja con HPLC es la calidad de los solventes que entran al equipo, puesto que pueden contener polvo u alguna partícula lo cual puede ser perjudicial para el equipo. Otro punto a tener en cuenta es la concentración de gases disueltos lo cual conlleva a la generación de burbujas en el interior del equipo. Este al ser un sistema cerrado con una sola entrada y no debe tener burbujas de aire porque pueden aumentar la presión interna, generar de picos cromatográficos extraños y generar diferencia entre los tiempos de retención (48).

Existen muchas formas de desgasificar solventes, entre los más frecuentes está la de colocar la solución en un baño de ultrasonido por varios minutos para asegurar que se hayan liberado los gases disueltos. Por otro lado, está la técnica de aspersion de nitrógeno la cual consiste en colocar un flujo de nitrógeno a la solución y hacerla burbujear (48).

También existe el desgasificador interno del equipo que consta de una bomba que extrae el aire de las soluciones y los desecha para así terminar de evitar el ingreso de gases disueltos al interior del equipo (48).

Para asegurar una correcta desgasificación de los solventes es necesario utilizar los dos métodos uno externo como el del baño de ultrasonido y siempre tener el desgasificador si es que el equipo lo tiene limpio y revisarlo periódicamente (48).

1.7. Validación del Método Analítico

Según “La Adecuación al uso de los métodos analíticos”, la validación de un método es básicamente el proceso para definir un requisito analítico, y la confirmación de que cuenta con capacidades consistentes con las aplicaciones requeridas (51).

Una vez desarrollado un método analítico al igual que una técnica analítica deberá de validarse, confirmar y documentar que los resultados producidos son confiables (47).

1.7.1. Cuando es Necesario una Validación

Las validaciones son necesarias como se mencionó para darle un valor extra a nuestros resultados. Se podría usar para controlar la calidad del agua potable de una población, análisis forenses para determinar la causa de muerte. Muchos trabajos necesitan resultados validados. Un método debe ser validado cuando es necesario demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para el uso previsto (51).

Por otro lado, no siempre se requieren los resultados validados por esta misma razón el que rige si un resultado es validado es la persona o el ente que requiera.

1.7.2. Parámetros para validar un método analítico

El método se semivalidara según los parámetros dados por “La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos”. Esta misma nos menciona que las características de desempeño son Linealidad, Limite de Detección, Limite de cuantificación , Precisión y Exactitud (51).

1.7.3. Linealidad

Es el intervalo en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable. El extremo inferior está determinado por el límite de cuantificación o también llamado LOQ y el extremo superior está determinado por las concentraciones donde se

observan anomalías en los resultados. Para poder evaluar el intervalo de trabajo debemos tener en cuenta la linealidad del método (51).

Entonces la linealidad es un ensayo analítico el cual se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta, conjuntamente se determina el “rango lineal” que es el rango determinado entre la menor concentración y la máxima concentración para el cual el método ha sido probado y dentro del cual puede efectuar un dosaje por interpolación de la curva estándar (47).

Para su determinación se tiene que preparar 6 a 10 patrones de un estándar a distintas concentraciones y medirlos por lo menos por duplicado y con estos datos poder generar estadísticas de regresión lineal (51).

El fin de este parámetro es la obtención de valores necesarios para el tratamiento de los resultados entre estos están la ecuación de la recta “ $y = bx + a$ ”, la cual es necesaria para la interpolación de los resultados; donde y es el valor del área bajo la curva, b es el valor del intercepto, x corresponde al valor de la concentración en este caso expresada en partes por millón, pero puede tomar otro valor dependiendo de la situación y a que representa a la pendiente (47).

El valor del coeficiente de correlación (R) que representa el nivel de relación entre 2 variables cuantitativas entre más se aproxime a la unidad podemos decir que las variables tienen más relación una con la otra (51).

1.7.4. Límites de Detección y Límites de Cuantificación

Parámetro analítico correspondiente a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Es importante conocer la concentración más baja del método que es el “Limite de Detección” (LOD); por otro lado, es importante conocer el nivel más bajo en el cual el desempeño es aceptable llamado “Limite de Cuantificación” (LOQ). Los valores de límites de detección y cuantificación pueden ser determinados a partir del uso de la curva de calibrado, ya que en el análisis de regresión lineal se obtienen los valores de “Error Típico o desviación estándar de Y y X” ($S_{y/x}$) y la pendiente (51) siendo necesarios para la obtención de los límites de cuantificación y determinación.

Siendo las ecuaciones:

$$\text{Límite de Detección: } \frac{3 \times S_{y/x}}{b}$$

$$\text{Límite de Cuantificación: } \frac{10 \times S_{y/x}}{b}$$

1.7.5. Límite de Detección

Da a conocer la mínima concentración la cual el método puede detectar, pero no necesariamente cuantificar, este parámetro expresa sus unidades de concentración (ppm, %, ppb, y otros) (51).

1.7.6. Límite de Cuantificación

Es la menor concentración la cual el equipo puede determinar con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas y se expresan en unidades de concentraciones. Estos límites pueden ser determinados en base a los datos de la curva cuando se haya considerado concentraciones bajas de analito, por extrapolación a concertación cero (51).

1.7.7. Precisión

Está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea (47). Este parámetro es expresado como la desviación estándar o más comúnmente como la desviación estándar relativa. Ambos estimadores nos permiten evaluar la incertidumbre en la estimación de la medida (error aleatorio correspondiente a la dispersión de datos alrededor de la medida).

La repetición es un factor importante para medir el desempeño del método en cuanto a la precisión. Se debe cumplir con algunas condiciones que son: realizar la medición el mismo analista, mismo instrumento en un corto plazo de tiempo en este caso sería el mismo día. Para la obtención de este valor es necesario aplicar una fórmula la cual es:

$$CV\% = \frac{S \times 100}{\bar{x}}$$

Donde S es la desviación estándar de los datos obtenidos y \bar{x} es el promedio de los resultados obtenidos y 100 para expresar el valor de porcentaje (47).

Para poder aceptar el valor obtenido se debe de tomar en cuenta el valor del coeficiente de variación de Horwitz el cual se obtiene con la siguiente fórmula:

$$CV_H\% = 2^{(1-0.5)\log C}$$

Donde el valor de C se refiere al valor a probar expresado en potencia 10 como por ejemplo si es 1 ppm sería 10^{-6} . Para poder aceptar el valor obtenido de sus resultados debe de ser menor a la mitad del valor obtenido por el coeficiente de variación de Horwitz (52).

1.7.8. Exactitud

La exactitud de medición expresa la proximidad de un único resultado a un valor de referencia, para la validación de métodos se trata de investigar la exactitud de los resultados evaluando los efectos sistemáticos y aleatorios sobre resultados individuales (51).

También llamado error sistemático o tendencia corresponde a la diferencia entre el valor obtenido y el valor verdadero (47).

Este valor se expresa según el porcentaje de recuperación por la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida; para esto se utilizará la siguiente fórmula:

$$\%R = \frac{ME - M}{St} \times 100$$

Donde ME representa la concentración de la muestra junto con la concentración añadida de estándar, M es la concentración de la muestra, St es la concentración del Estándar y 100 para darle el valor de porcentaje.



CAPITULO II:



CAPÍTULO II

2. Materiales y Métodos

2.1. Materiales

2.1.1. Equipos de Laboratorio

- **Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución:**

Marca: Hitachi
Modelo: LaChrom Elite
Detector: UV-Visible
Columna: LiChroCART RP-18 125mm x 4mm x 5µm
Software: EZ Chrom Elite

- **Balanza analítica:**

Marca: OHAUS
Modelo: Discovery
Sensibilidad: 0.1 mg

- **Purificador de agua:**

Marca: ELGA LabWater
Modelo: PURELAB Classic
Resistividad a 25 °C: 18,2 MΩ•cm

- **Agitador tipo vórtex:**

Marca: Thermo SCIENTIFIC
Modelo: Maxi Mix II

- **Bomba de aspiración:**

Marca: Lab Companion
Modelo: VE-11

2.1.2. Reactivos

- Estándar de Ácido Cafeico $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich Estados Unidos)
- Estándar de Ácido *p*-Cumárico $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich Estados Unidos)
- Estándar de Quercetina $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich Estados Unidos)
- Metanol grado HPLC (Merck Peruana SA, Perú)
- Agua calidad Ultra Pura
- Ácido Fórmico (Merck Peruana SA, Perú)

2.1.3. Materiales

- Fiolas de 5, 10, 50, 100 mL
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 5 mL.
- Probetas de 100 mL.
- Vasos de precipitado de 25, 50 y 100 mL.
- Baguetas.
- Espátulas.
- Embudo
- Sistema de filtración al vacío
- Papel filtro
- Tubos de ensayo 18 x 150 mm
- Gradilla
- Frascos de vidrio de 1L
- Jeringas descartables de 10 mL.
- Filtro de membrana de nylon 0.45 μm (Whatman)
- Filtros de jeringa ANOTOP 0.22 μm (RephiQuik)

2.2. Métodos

2.2.1. Obtención de la Muestra

Las muestras fueron seleccionadas por las siguientes características:

- Las uvas para la preparación debieron ser cultivadas en el valle de Aplao, el vino producido debió de ser tinto.
- Las muestras fueron tomadas directamente de las casas vitivinícolas del valle de Aplao, las muestras fueron adquiridas y almacenadas en su envase propio de 900 mL.

2.2.2. Cromatografía Líquida de Alta Performance

2.2.2.1. Condiciones Cromatográficas

- Equipo: Cromatógrafo líquido de alta resolución
- Columna: LiChroCART RP-18 125mmx 4 mm x 5 μ m
- Fase móvil A: Acido Fórmico 4.5%
- Fase móvil B: Metanol
- Detector: UV-Visible, 285nm
- Velocidad de flujo: 1 mL /minuto
- Volumen de inyección: 10 mL
- Tiempo de corrida: 18 minutos

2.2.2.2. Preparación de la solución Stock y diluciones del estándar de Ácido Caféico

Se pesó 4.04 mg del estándar de Ácido Caféico y se enrasó con una solución Metanol/Agua (1:1) en una fiola ámbar de 10 mL llegando a una concentración de 404 ppm, a esta solución se le conocerá como solución stock. A partir de esta se prepararon seis soluciones estándar a distintas concentraciones. De la solución stock se transfirió 0.1 mL a una fiola ámbar de 10 mL y se enrasó con la mezcla Metanol/Agua (1:1) obteniendo una concentración de 4.04 ppm; para las posteriores soluciones se tomaron 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mL de la solución stock y realizando el mismo procedimiento dio como resultado las concentraciones 8.08, 12.12, 16.16, 20.20, 24.24 ppm, respectivamente.

2.2.2.3. Preparación de la solución Stock y diluciones del estándar de Ácido *p*-Cumarico

Se pesó 4.4 mg del estándar de Ácido *p*-Cumarico y se enrasó con una solución Metanol/Agua (1:1) en una fiola ámbar de 10 mL llegando a una concentración de 440 ppm, a esta solución se le conocerá como solución stock. A partir de esta se prepararon seis soluciones estándar a distintas concentraciones. De la solución stock se transfirió 0.1 mL a una fiola ámbar de 10 mL y se enrasó con la mezcla Metanol/Agua (1:1) obteniendo una concentración de 4.4 ppm; para las posteriores soluciones se tomaron 0.2, 0.3, 0.4,

0.5, 0.6 mL de la solución stock y realizando el mismo procedimiento dio como resultado las concentraciones 8.8, 13.2, 17.6, 22, 26.4 ppm, respectivamente.

2.2.2.4. Preparación de la solución Stock y diluciones del estándar de Quercetina

Se pesó 4.04 mg del estándar de Quercetina y se enrasó con una mezcla Metanol/Agua (1:1) en una fiola ámbar de 10 mL llegando a una concentración de 404 ppm, a esta solución se le conocerá como solución stock. A partir de esta se prepararon seis soluciones estándar a distintas concentraciones. De la solución stock se transfirió 0.1 pres una fiola ámbar de 10 mL y se enraso con la solución Metanol/Agua (1:1) obteniendo una concentración de 4.04 ppm; para las posteriores soluciones se tomaron 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mL de la solución stock y realizando el mismo procedimiento dio como resultado las concentraciones 8.08, 12.12, 16.16, 20.20, 24.24 ppm, respectivamente.

2.2.2.5. Preparación de la Fase Móvil

Para la preparación de las fases móviles fue necesario trabajar con solventes grado HPLC como mínimo, por lo que se optó por usar Metanol grado HPLC y Acido Fórmico grado HPLC.

Para la preparación de la fase móvil A (Ácido Fórmico al 4.5% en agua), se necesitó un purificador de agua para la obtención de agua Ultrapura y se revisó constantemente su conductividad la cual siempre debe estar en 18.2 Mohm para asegurar su calidad.

La fase móvil B (Metanol), se obtuvo directamente del envase, midiendo la cantidad necesaria para cada análisis.

Para asegurar que las fases móviles estén sin rastro de partículas que puedan ingresar al HPLC se llevaron a un equipo de filtración HPLC con un filtro de un tamaño de 0.45 μ m hidrofílico, posteriormente se colocó las fases móviles en frascos. Finalmente pasaron por un baño de ultrasonido por 10 minutos para eliminar los restos de oxígeno disuelto que hayan podido quedar.

2.2.2.6. Preparación de la muestra

Para la preparación de la muestra se usó el método usado por Rebolo López donde las muestras fueron agitadas en sus envases, luego se filtró una pequeña cantidad con filtros 0.45 um los cuales se acoplaron a una jeringa y se procedió a filtrar, el resultante se colocó en viales de HPLC y se pasó al equipo para su lectura, la alícuota tomada por el equipo se dio por inyección directa sin otro tratamiento adicional (53).

2.2.2.7. Validación del Método

2.2.2.7.1. Linealidad

Para la determinación de la linealidad se debe de realizar siete mediciones a distintas concentraciones y por triplicado. Posteriormente se debe de graficar la respuesta en un gráfico donde el eje y sea el área bajo la curva, en función del eje x que será la concentración de los patrones (51).

Los criterios de aceptabilidad son en primer lugar una examinación visual, donde observaremos los valores atípicos que no se encuentren en la línea central trazada. Después se tendrá en cuenta el valor de R que es el coeficiente de correlación el cual debería de ser lo más cercano a la unidad para poder afirmar que existe relación entre las variables que en este caso son el área bajo la curva y las concentraciones (51).

Finalmente se tomara en consideración las estadísticas necesarias para la evaluación de los datos (51). En este caso se determinará si existe o no correlación significativa utilizando la prueba estadística de T-Student, donde se determinaran dos valores que son el T_r y $T_{critico}$, donde T_r explica valor del estimador T-Student para el coeficiente de correlación y el T critico es el valor hallado a partir de tablas de T-Student a 2 colas, con un nivel de confianza del 95% y con n-2 grados de libertad (52).

Para determinar el valor de T_r se usará la siguiente formula:

$$T_r = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

Donde:

R= Coeficiente de correlación

R²= Coeficiente de determinación

n= numero de patrones utilizados

Para poder afirmar si existe correlación significativa, se tiene que esperar que:

$$t_r > t_{\text{Critico}}$$

2.2.2.7.2. Límites de Determinación y Cuantificación

Para determinar los límites de cuantificación y límites de detección puede realizarse a partir de la curva de calibración. Para esto se usa el valor de la desviación estándar $S_{y/x}$ la cual se puede obtener del programa Excel y el valor de la pendiente directamente de la curva de calibrado. Estos datos serán expresados en la ecuación:

$$\text{Límite de Detección: } \frac{3 \times S_{y/x}}{b}$$

$$\text{Límite de Cuantificación: } \frac{10 \times S_{y/x}}{b}$$

2.2.2.7.3. Precisión

La determinación de la precisión se realiza en base a la repetición. En este caso se realiza a una de las concentraciones de nuestra curva de calibrado, la cual según la guía Eurachem de validación se debe de repetir seis veces como mínimo (51).

Obtenidos los datos podemos usar la fórmula:

$$CV\% = \frac{S \times 100}{\bar{x}}$$

Para comprobar que los valores son correctos deben de ser corroborados contra la ecuación del coeficiente de variación de Horwitz, el valor obtenido debe de ser menor a la mitad del valor del coeficiente de Horwitz.(52).

$$CV_H\% = 2^{(1-0.5)\log C}$$

2.2.2.7.4. Exactitud

El valor de exactitud se determinó por medio de la recuperación. Para este caso se prepara un patrón de cada uno de los compuestos de concentración conocida, y se hace la comparación entre el valor obtenido con el valor teórico obteniendo un porcentaje de recuperación. Obtenidos los resultados se usará la siguiente formula:

$$\%R = \frac{ME - M}{St} \times 100$$

Donde:

ME = Área bajo la curva de analito de la muestra enriquecida

M = Área bajo la curva de analito medida en la muestra sin adicionar

St= Área bajo la curva de analito adicionado a la muestra enriquecida

Los valores obtenidos deberán estar dentro de una tabla ya establecida por la AOAC la cual podrá dar valor a nuestros resultados.

Unidad	Recuperación
100 ppm	90-107%
10 ppm	80-110%
1 ppm	
100 ppb	60-115%
10 ppb	
1 ppb	

En cuanto a la estadística a utilizar para determinar si existe diferencia significativa por lo que se utilizara la prueba T-Studentt para determinar este valor. Es necesario hallar $T_{\text{calculado}}$ y T_{critico} , donde el T_{critico} explica el uso de las tablas de T-Student al 95% de confianza, a dos colas y con n-1 grados de libertad, por otro lado el $T_{\text{calculado}}$ se refiere al valor obtenido a partir de nuestros resultados siguiendo la siguiente formula:

$$T_{\text{calculado}} = \frac{100 - \%R}{S \times \sqrt{n}}$$

Donde:

%R= el promedio del porcentaje de recuperación

S= Desviación Estándar de las recuperaciones

n= Número de ensayos realizados

El criterio de aceptabilidad seria que $T_{\text{calculado}} \leq T_{\text{critico}}$, explicando que no hay diferencia estadísticamente significativa.

2.2.2.8. Muestras

Todas las muestras fueron corridas en el equipo HPLC por duplicado



CAPITULO III:

CAPÍTULO III

3. Resultado y Discusión

En esta última parte de la tesis se presenta los resultados obtenidos dividido en los siguientes segmentos:

- **Linealidad:** Se relacionará dos variables que son el área bajo la curva resultado del ensayo realizado y la concentración de diferentes patrones.
- **Tiempo de Retención:** Se determina el tiempo en el que aparecen los picos cromatográficos (elución), estos deben de tener una correcta separación dada por el valor de la resolución.
- **Límites de cuantificación y detección:** Se determina a través de la concentración mínima que puede determinar el equipo y a su vez poder determinar la concentración mínima cuantificable
- **Precisión:** Parámetro necesario para poder reconocer la dispersión existente entre varias medidas alrededor de un valor medio.
- **Exactitud:** Valor necesario para determinar la diferencia existente entre un valor que se obtiene a partir del método puesto a prueba con un valor verdadero.
- **Aplicación de la Técnica Analítica:** Se explicará cómo se utilizó el método para la obtención de los resultados de las muestras.

3.1. Linealidad

La linealidad, es un factor importante al momento de la determinación de cualquier compuesto, ya que se necesita saber si el método tiene un comportamiento lineal. Por esto, se utilizan distintas concentraciones de estándares de menor a mayor concentración las cuales según bibliografía o según algún ensayo piloto, dan lugar a una curva de calibrado, en la cual se encuentran las concentraciones de las muestras.

Para la realización de este método se midió los tres analitos buscados en vinos que son Ácido Caféico, Ácido *p*-Cumárico y Quercetina por triplicado. Las concentraciones usadas fueron 4.04, 8.08, 12.12, 16.16, 20.20, 24.24 ppm para el Ácido Caféico; 4.40,

8.80, 13.20, 17.60, 22.00, 26.40 ppm para el Ácido *p*-Cumárico y 4.04, 8.08, 12.12, 16.16, 20.20, 24.24 ppm para la Quercetina, obteniéndose así los valores representados en las tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1. Promedio, Desviación Estándar y Coeficiente de Variación de las Áreas
Bajo la Curva para Ácido Caféico

Ácido Caféico						
Concentración	Área Cromatográfica			Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación %
	I	II	III			
0.00	126542	126542	126548	126544	3.46	0.0027
4.04	1619710	1619710	1619824	1619748.00	65.82	0.0041
8.08	3225741	3225741	3225795	3225759.00	31.18	0.0010
12.12	4851561	4827880	4835852	4838431.00	12049.31	0.2490
16.16	6467692	6458988	6460745	6462475.00	4602.67	0.0712
20.2	8116166	8102026	8114569	8110920.33	7744.00	0.0955
24.24	9743584	9730398	9735378	9736453.33	6658.45	0.0684

Tabla 2. Promedio, Desviación Estándar y Coeficiente de Variación de las Áreas
Bajo la Curva para Ácido *p*-Cumárico

Ácido <i>p</i>-Cumárico						
Concentración	Área Cromatográfica			Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación %
	I	II	III			
0.00	126542	126543	126548	126544.3333	3.21	0.0025
4.40	2402541	2402541	2402641	2402574.333	57.74	0.0024
8.80	4634137	4634137	4634138	4634137.333	0.58	0.0000
13.20	6941388	6929852	6935589	6935609.667	5768.03	0.0832
17.60	9224432	9224867	9224455	9224584.667	244.78	0.0027
22.00	11752367	11741890	11749785	11748014	5458.41	0.0465
26.40	14130002	14107465	14122658	14120041.67	11494.04	0.0814

Tabla 3. Promedio, Desviación Estándar y Coeficiente de Variación de las Áreas
Bajo la Curva para Quercetina

Concentración	Quercetina					
	Área Cromatográfica			Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación %
	I	II	III			
0.00	126542	126542	126548	126544	3.46	0.0027
4.04	253173	254144	253958	253758.3333	515.37	0.2031
8.08	577044	577326	577330	577233.3333	163.98	0.0284
12.12	867429	865233	867422	866694.6667	1265.85	0.1461
16.16	1177984	1175368	1175278	1176210	1536.99	0.1307
20.2	1479672	1475996	1477541	1477736.333	1845.77	0.1249
24.24	1710343	1715957	1716584	1714294.667	3436.57	0.2005

En las tablas 1, 2 y 3 se muestran las concentraciones de trabajo que se escogieron para realizar la curva de calibrado. En segundo lugar, la respuesta del equipo expresada en área bajo la curva que se obtuvo. Este ensayo se realizó por triplicado para asegurar los resultados y seguir con lo recomendado por la guía Eurachem (51). Posteriormente se determinó el promedio el cual es necesario para poder realizar la siguiente parte del ensayo.

Los dos últimos valores se calcularon con el fin de demostrar el coeficiente de variación, el cual representa la dispersión de los resultados, al ser calculado para cada una de las concentraciones con sus respectivas repeticiones de los tres analitos en cuestión. Se observa que se obtuvo valores menores a la unidad lo cual denota que existe poca dispersión entre los resultados obtenidos lo que significa que no se obtuvo resultados atípicos.

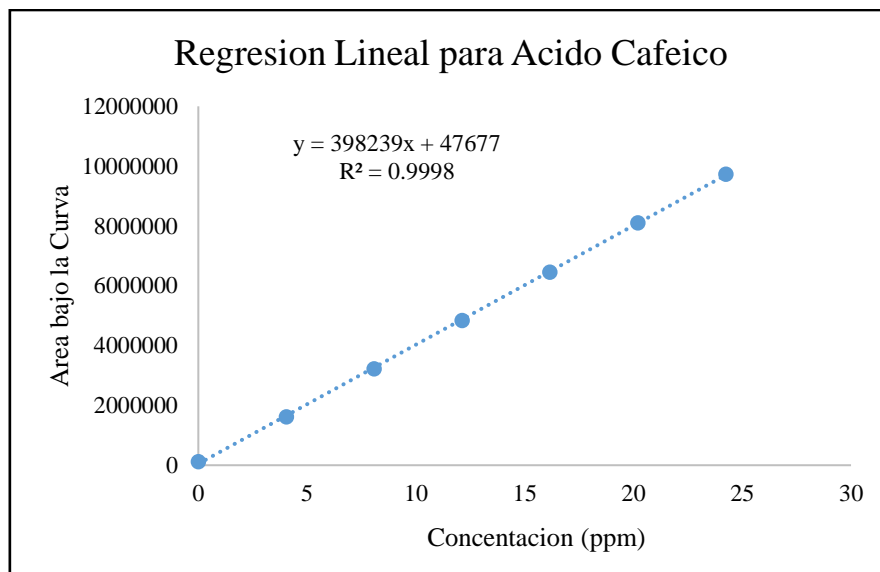


Figura 3.1: Resultados de la curva de calibrado del Ácido Cafeico

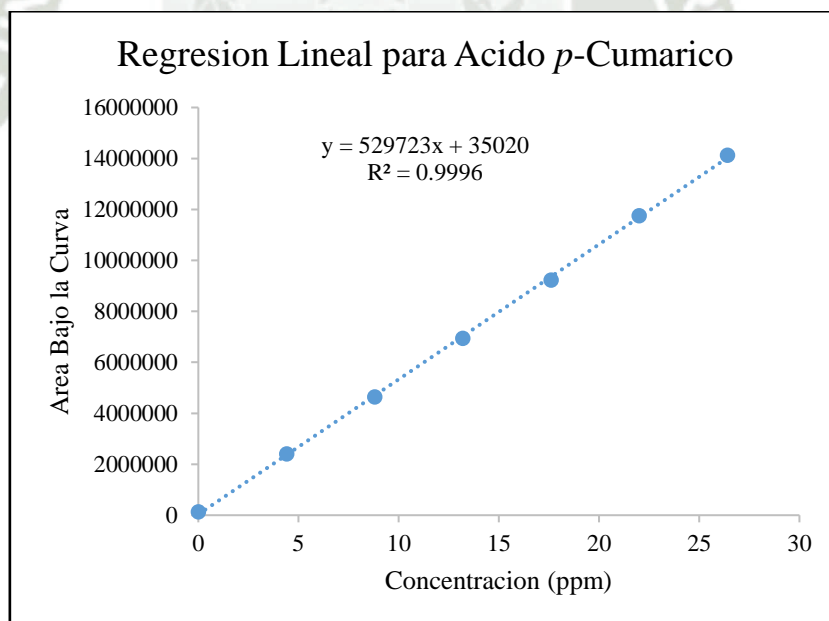


Figura 3.2: Resultados de la curva de calibrado del Ácido *p*-Cumárico

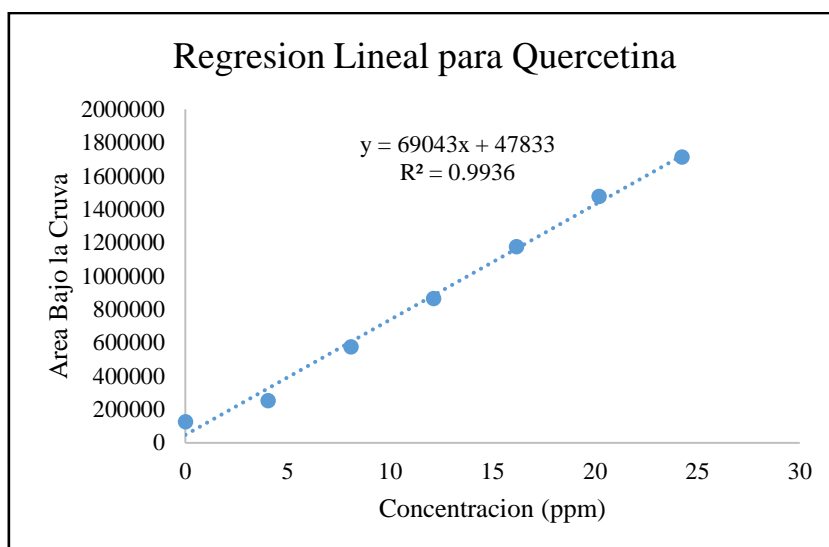


Figura 3.3: Resultados de la curva de calibrado de Quercetina

En las figuras 3.1, 3.2, 3.3, se representan las curvas de calibración de Ácido Caféico, Ácido *p*-Cumarico y Quercetina respectivamente, donde en el eje Y se encuentra el área bajo la curva expresada en valores de respuesta del equipo y en el eje X las concentraciones respectivas expresadas en partes por millón (ppm).

En estas figuras se graficaron seis puntos los cuales representan las concentraciones de Ácido Caféico, Ácido *p*-Cumarico y Quercetina tomadas para crear una curva de calibrado; posteriormente se traza una línea recta a través de los puntos y se observa que la mayoría de los puntos pasan a través de esta línea en los tres casos por lo que en primera instancia se puede decir que existe linealidad.

Por otra parte también se obtuvo valores importantes como el valor de R^2 o también llamado Coeficiente de Determinación, este valor es importante puesto a que si este valor es cercano a la unidad podemos tener la certeza de que el método es lineal. Otro valor importante que nos servirá para la determinación de los resultados es la ecuación de la recta, con la cual podemos determinar concentraciones a partir de sus áreas bajo la curva y la pendiente para determinar los límites de cuantificación y determinación.

Para poder evaluar el ensayo de linealidad se utilizará la prueba de T de Student, donde se determinara el T_r y $T_{critico}$, para cada uno de los resultados obteniéndose así:

Para el Ácido Caféico:

$$T_r = \frac{|0.9999|\sqrt{7-2}}{\sqrt{1-0.9998}} = 158.11$$

Para el Ácido *p*-Cumarico:

$$T_r = \frac{|0.9998|\sqrt{7-2}}{\sqrt{1-0.9996}} = 111.78$$

Para la Quercetina

$$T_r = \frac{|0.9967|\sqrt{7-2}}{\sqrt{1-0.9936}} = 27.86$$

A continuación se halla el valor de T_{critico} utilizando la tabla de 2 colas de T (anexo 1) una confianza del 95% y los grados de libertad $n-2$, obteniéndose así el valor de 2.57, para los tres casos.

Viendo que los valores son mayores al valor critico se cumple que $T_r > T_{\text{critico}}$, explicando que existe correlación lineal significativa.

Podemos afirmar que la metodología usada fue correcta para determinar estos tres compuestos en una sola corrida ya que se pudo demostrar el coeficiente de correlación R^2 cumple con lo requerido para su uso y en cuanto a su linealidad podemos observar que en los tres casos las concentraciones requeridas mantuvieron un comportamiento lineal y estadísticamente se determinó que existe correlación lineal significativa, por lo tanto, podemos usarlo para determinar concentraciones de los analitos

Tabla 4. Resultados Estadísticos para Acido Cafeico

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.999913906
Coefficiente de determinación R^2	0.999827819
Error típico	49963.01523
Numero de Concentraciones	7

Tabla 5. Resultados Estadísticos para Acido *p*-Cumárico

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.999824372
Coefficiente de determinación R ²	0.999648775
Error típico	103386.5014
Numero de Concentraciones	7

Tabla 6. Resultados Estadísticos para Quercetina

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.996777199
Coefficiente de determinación R ²	0.993564784
Error típico	42122.77474
Numero de Concentraciones	7

Las tablas 4, 5, 6, son resultado del paquete estadístico de regresión lineal de Excel, donde recibimos datos importantes para la validación de los resultados. En primer lugar, está el valor de coeficiente de correlación también conocido como R. Este valor explica tres cosas: Primero que la relación es positiva, en otras palabras, que la curva será en un sentido creciente; que es directa ya que, a mayor concentración, mayor será el valor del área bajo la curva y por último el valor es cercano a la unidad por lo que existe alta correlación entre las variables área bajo la curva y concentración. En todos los casos, se demuestra estas tres características positivas, directa y de alta correlación.

Luego está el Coeficiente de determinación o también llamado R² el cual demuestra el nivel de variabilidad que existe entre el área bajo la curva y que puede ser explicado por la concentración; cuando este valor es próximo a la unidad quiere decir que existe linealidad. Para este caso se observa que el resultado de las tablas para el Ácido Cafeico es de 0.9998, para el Ácido *p*-Cumárico es de 0.9996 y finalmente para la Quercetina es de 0.9936, valores son cercanos a la unidad. Con estos resultados podemos afirmar que existe correlación y linealidad de los resultados en estas 3 curvas ya que los valores de R² son superiores a 0.99 lo cual a simple vista demuestra una linealidad, pero como se demostró anteriormente es necesaria una prueba estadística para corroborar si existe correlación lineal (47).

En las tablas también se observa el error típico también conocido como desviación estándar S_x/y , el cual es el valor a usar para determinar la sensibilidad del método mediante los límites de cuantificación y determinación.

Finalmente, el número de concentraciones se refiere al número de patrones que se hayan utilizado para todos los casos se utilizaron siete.

3.2. Tiempos de Retención

Para poder determinar algún compuesto mediante HPLC se debe determinar el tiempo de elución del analito solo. Así se puede determinar que este tiempo será el que en futuras corridas nos dará la certeza de que el compuesto buscado será el que tenemos presente.

En el experimento se pudo determinar que los tiempos de retención fueron:

Tabla 7. Tiempos de Retención de los analitos

Compuesto	Tiempo de Retención (min)
Ácido Cafeico	3.8 ± 0.4
Ácido <i>p</i> -Cumárico	6.7 ± 0.4
Quercetina	16.9 ± 0.4

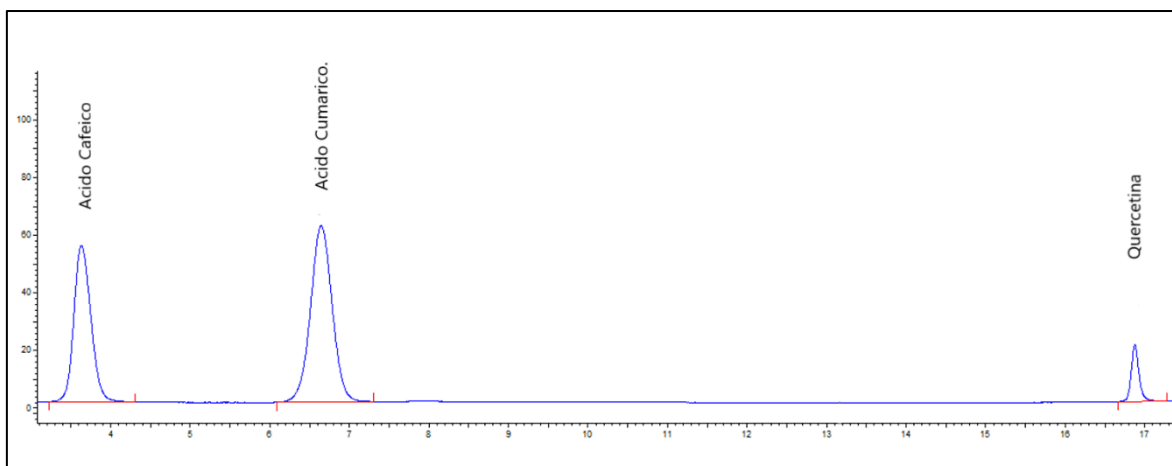


Figura 3.4: Cromatograma para determinar los tiempos de Retención

En la figura 3.4 se observa que se realizó un mix de los analitos a determinar; para lo cual, se utilizó una concentración media de los compuestos Ácido Caféico, Ácido *p*-Cumárico y Quercetina. Es importante recalcar que los picos se ven bien definidos y los tiempos de separación son de más de 2 minutos entre los picos para poder evitar que se superpongan entre ellos y dar una respuesta incorrecta.

3.2.1 Resolución

La resolución es un término utilizado para explicar el grado de separación entre picos cromatográficos que están juntos con respecto a sus anchos, el valor resultante es adimensional, pero se considera correcto cuando es superior o igual a 1.5.

Para lo cual es necesario utilizar la fórmula:

$$R_s = \frac{2(T_{r_B} - T_{r_A})}{\omega_A + \omega_B}$$

Donde:

R_s = Resolución

T_{r_B} = Tiempo de retención del pico B

T_{r_A} = Tiempo de retención del pico A

ω_A = Ancho del pico A

ω_B = Ancho del pico B

Obteniéndose los siguientes resultados:

$$Rs(a-b) = \frac{2(6.8-3.8)}{4-3.2+7.1-6.2} = 3.5$$

$$Rs(b-c) = \frac{2(16.9-3.8)}{7.1-6.2+17.1-16.6} = 18.7$$

$$Rs(a-c) = \frac{2(16.9-3.8)}{4-3.2+17.1-16.6} = 25$$

Los resultados obtenidos para la primera ecuación $Rs(a-b)$, son calculados para los picos Ácido Caféico (a) y para el Ácido *p*-Cumarico (b) dando como resultado 3.5.

En la segunda ecuación se calculó la resolución para los picos del Ácido *p*-Cumarico y Quercetina dando como resultado 18.7.

Para la tercera ecuación se calculó para los picos de Ácido Caféico (a) y Quercetina (c) dando como resultado 25.

Para los tres picos cromatográficos se determinó la resolución dando como resultados valores superiores a 1.5 lo demuestra que el área de un pico no interfiere con la del otro, dando lugar a resultados confiables.

Se puede observar el cromatograma a primera vista que los picos cromatográficos del Ácido Caféico, Ácido *p*-Cumarico y Quercetina son separados por más de un minuto lo que en primera instancia demostraría una correcta separación de estos, pero para corroborar lo observado se determinó el valor de resolución el cual demostró ser aceptable para los tres picos evidenciando una correcta separación.

3.3. Límites de Detección y Cuantificación

Usamos los Límites de Cuantificación (LOQ) y Límites de Detección (LOD). Para garantizar que la cantidad medida por nuestro método es la correcta. Para obtener estos valores se ha tomado en cuenta el valor de la pendiente de las tablas 4, 5 y 6 de linealidad como también el error típico de las mismas para calcular estos valores.

Por lo expuesto:

A. Ácido Caféico

$$LOD = \frac{3 * 49963.015}{402143.2} = 0.3764$$

$$LOQ = \frac{10 * 49963.015}{402143.2} = 1.2546$$

Dando como resultado 0.3764 ppm para el Limite de Detección (LOD) y 1.2546 ppm para el Limite de Cuantificación (LOQ).

B. Ácido *p*-Cumárico

$$LOD = \frac{3 * 103386.5014}{529722.6} = 0.5855$$

$$LOQ = \frac{10 * 103386.5014}{529722.6} = 1.9517$$

Dando como resultado 0.5855 ppm para el Limite de Detección (LOD) y 1.9517 ppm para el Limite de Cuantificación (LOQ).

C. Quercetina

$$LOD = \frac{3 * 42122.774}{69043.358} = 1.8302$$

$$LOQ = \frac{10 * 42122.774}{69043.358} = 6.1009$$

Dando como resultado 1.8302 ppm para el Limite de Detección (LOD) y 6.1009 ppm para el Limite de Cuantificación (LOQ).

Los valores obtenidos para los limites de detección expresan la mínima concentración la cual el equipo HPLC puede detectar, pero este valor no es el usado puesto a que al ser el mínimo valor que el equipo pueda detectar este podría dar resultados erróneos, por lo que también se calcula los valores de límite de cuantificación que es el valor que puede diferenciarse del ruido o cualquier otro interferente que se presente. Por tanto, para los resultados obtenidos para el Ácido Caféico, Ácido *p*-Cumarico y Quercetina los valores 1.2546, 1.9517 y 6.1009 ppm son los valores mínimos que se pueden cuantificar a partir de nuestra curva de calibración, valores menores a estos no serían fiables.

3.4. Precisión

Para poder medir la precisión se debe de tomar una serie de mediciones a una sola concentración. A este ensayo se le conoce como repetibilidad la cual se realiza mediante la toma de mediciones de un punto en específico, comúnmente el punto del medio de la curva de calibrado para este caso se usó las concentraciones de 12.12, 13.20 y 12.12 ppm para el Ácido Caféico, Ácido *p*-Cumárico y Quercetina, respectivamente.

Las repeticiones deberán de ser 6 veces y también se requiere el cálculo de la desviación estándar relativa obteniéndose así los siguientes resultados:

Tabla 8. Repeticiones y desviación estándar relativa para Acido Caféico

Ácido Caféico	
Repeticiones	Área
I	4861551
II	4824870
III	4825852
IV	4827470
V	4816580
VI	4825698
Promedio	4830336.8
Desviación Estándar (S)	15769.034
Coefficiente de Variación (CV%)	0.33%

Tabla 9. Repeticiones y desviación estándar relativa para Acido *p*-Cumárico

Ácido <i>p</i>-Cumárico	
Repeticiones	Área
I	6941598
II	6968842
III	6945587
IV	6936583
V	6964577
VI	6955185
Promedio	6952062
Desviación Estándar (S)	12953.51
Coefficiente de Variación (CV%)	0.19 %

Tabla 10. Repeticiones y desviación estándar relativa para Quercetina

Quercetina	
Repeticiones	Área
I	864420
II	866429
III	875233
IV	864422
V	867429
VI	862896
Promedio	866804.83
Desviación Estándar (S)	4431.91
Coefficiente de Variación (CV%)	0.51%

Para las tablas 8, 9 y 10, se determinó la precisión con un ensayo de repetibilidad; para lo cual, se realizaron 5 repeticiones de una concentración media de la curva de calibración de los analitos a determinar. Se tomaron las áreas y se utilizó la fórmula para hallar el valor del Coeficiente de Variación dando como resultado 0.33%, 0.19% y 0.51% para el Ácido Caféico, Ácido *p*-Cumarico y Quercetina, respectivamente.

Posteriormente se determinó el valor del coeficiente de variación de Horwitz donde se obtuvieron los siguientes resultados:

Para el Ácido Caféico:

$$CV_H \% = 2^{(1-0.5)\log(0.00001212)} = 9.09\%$$

Para el Ácido *p*-Cumarico

$$CV_H \% = 2^{(1-0.5)\log(0.00001320)} = 9.22\%$$

Para la Quercetina

$$CV_H \% = 2^{(1-0.5)\log(0.00001212)} = 9.09\%$$

Los resultados obtenidos en base al coeficiente de variación de Horwitz fueron 9.09%, 9.22% y 9.09% para el Ácido Caféico, Ácido *p*-Cumarico y Quercetina, respectivamente.

Los resultados obtenidos del coeficiente de variación de las repeticiones son: 0.33%, 0.19% y 0.51% para Ácido Caféico, Acido *p*-Cumarico y Quercetina respectivamente estos valores son menores a la mitad del coeficiente de Horwitz siendo: 9.09%, 9.22% y 9.09% para Ácido Caféico, Ácido *p*-Cumarico y Quercetina respectivamente. Lo cual demuestra fiabilidad a los resultados obtenidos.

3.5. Exactitud

Parámetro necesario para saber la diferencia entre el valor obtenido y el valor verdadero; en otras palabras, expresa la proximidad de un único resultado a un valor de referencia, como también, para poder afirmar que no haya errores groseros o equivocaciones al momento de haber realizado los ensayos. Para poder realizar este método se tomó 2 alícuotas de una muestra, también se hizo una solución a una concentración aproximada a 10 ppm de los estándares Ácido Caféico, Ácido *p*-Cumárico y Quercetina, y otras 2 soluciones con muestra más el estándar preparado de concentración conocida.

Tabla 11. Porcentaje de Recuperación para Acido Cafeico

Rep.	Muestra	Estándar	Muestra+ Estándar	R	%R
I	1022855	3928826	4751532	0.949	94.906
II	1035685	4005999	4865135	0.956	95.593
III	1027598	4002599	4748153	0.930	92.953
IV	1027598	3955632	4718618	0.933	93.311
V	1053356	4021564	4898448	0.956	95.612
Promedio	1033418.4	3982924	4796377.2	0.945	94.477

Tabla 12. Porcentaje de Recuperación para Acido *p*-Cumárico

Rep.	Muestra	Estándar	Muestra+ Estándar	R	%R
I	1029666	5295847	6111725	0.9596	95.963
II	1037566	5196879	6015014	0.9578	95.778
III	1027489	5269859	6025187	0.9484	94.836
IV	1027465	5123481	6022558	0.9749	97.494
V	1024864	5245585	6122593	0.9718	97.181
Promedio	1029410	5226330.2	6059415.4	0.962	96.244

Tabla 13. Porcentaje de Recuperación para Quercetina

Rep.	Muestra	Estándar	Muestra + Estándar	R	%R
I	1022855	738248	1705692	0.9249	92.494
II	1035685	728563	1685963	0.8925	89.255
III	1046558	721552	1708115	0.9169	91.685
IV	1035582	725623	1673255	0.8788	87.879
V	1035522	724893	1688952	0.9014	90.142
Promedio	1035240.4	727775.8	1692395.4	0.903	90.296

Después de realizado los ensayos se pudo obtener resultados de 94.477%, 96.244% y 90.296% para Acido Cafeico, Acido *p*-Cumárico y Quercetina, respectivamente.

Según lo explicado por la AOAC nos muestra una tabla la cual se usó como referencia para validar los resultados. En esta tabla se explica que para una concentración de 10 ppm podemos obtener un resultado de porcentaje de recuperación entre 80-110%.

Para poder evaluar el ensayo de recuperación se utilizará prueba de T de Student, donde se determinará los valores de $T_{\text{calculado}}$ y T_{critico} .

Los valores de $T_{\text{calculado}}$ para cada uno de los resultados son:

Para el Ácido Caféico:

$$T_{\text{calculado}} = \frac{100-92.466}{1.7953 \times \sqrt{5}} = 2.1833$$

Para el Ácido *p*-Cumarico:

$$T_{\text{calculado}} = \frac{100-95.057}{0.9290 \times \sqrt{5}} = 1.729$$

Para la Quercetina

$$T_{\text{calculado}} = \frac{100-90.296}{1.6559 \times \sqrt{5}} = 2.6207$$

A continuación se encuentra el valor de T_{critico} utilizando la tabla T-Student de 2 colas a una confianza del 95% (ANEXO 1) y los grados de libertad n-1, obteniéndose así el valor de 2.78, para los tres casos.

Viendo que los valores son menores al valor critico se cumple que $T_{\text{calculado}} \leq T_{\text{critico}}$, explicando que no existe diferencias significativas.

3.6. Aplicación Analítica

Se tomaron muestras de vinos de distintas casas vitivinícolas de la provincia de Castilla en el distrito de Aplao, se escogió a estas por su trascendencia y popularidad entre los pobladores, en total se escogieron 7 muestras nombradas como A, B, C, D, E, F, G.

A continuación, se presentarán los resultados obtenidos en la siguiente tabla.



Tabla 14. Tabla de Resultados

MUESTRA	TIEMPOS DE RETENCION (min)			AREA BAJO LA CURVA			CONCENTRACION (ppm)			PROMEDIO CONCENTRACION (ppm)		
	Ácido Cafeico	Acido <i>p</i> -Cumárico	Quercetina	Ácido Cafeico	Acido <i>p</i> -Cumárico	Quercetina	Ácido Cafeico	Acido <i>p</i> -Cumárico	Quercetina	Ácido Cafeico	Acido <i>p</i> -Cumárico	Quercetina
A	3.92	7.25	17.25	892884	5123978	372276	2.27	13.93	6.41	2.28	13.96	6.45
A	3.94	7.29	17.27	900275	5147025	380476	2.29	14.00	6.50			
B	3.92	7.27	17.29	1385762	7119126	485161	3.50	19.34	7.59	3.51	19.34	7.58
B	3.94	7.28	17.3	1394153	7124462	482159	3.52	19.35	7.56			
C	3.87	7.22	17.3	1822855	1089666	598046	4.58	3.01	8.77	4.65	3.01	8.43
C	3.94	7.27	17.3	1873888	1088551	532856	4.71	3.00	8.09			
D	3.96	7.28	17.28	1406648	719039	516889	3.55	2.00	7.92	3.50	2.00	8.18
D	3.9	7.21	17.29	1365619	718059	566460	3.45	2.00	8.44			
E	3.89	7.21	17.29	581336	904352.5	385513	1.50	2.51	6.55	1.50	2.50	6.55
E	3.85	7.19	17.28	583771	903305	386455	1.50	2.50	6.56			
F	3.83	7.09	17.26	1469174	4706076	418483	3.70	12.80	6.89	3.71	12.81	6.86
F	3.82	7.01	17.24	1470119	4712494	410948	3.71	12.82	6.82			
G	3.77	6.95	17.23	1591490	2340435	467686	4.01	6.39	7.41	4.02	6.39	7.52
G	3.77	6.95	17.23	1597951	2338869	488704	4.02	6.39	7.63			

En la tabla 14 se observan los tiempos de retención de todas las corridas, cada muestra se realizó por duplicado, luego están las áreas bajo la curva de cada repetición. A partir de los valores de las áreas bajo la curva se realizaron las conversiones a partes por millón mediante la ecuación de las curvas de calibrado del Ácido Caféico, Ácido *p*-Cumarico y Quercetina, obtenidas en el ensayo de linealidad. Luego se procedió a realizar el promedio de estos duplicados para el análisis de los datos.

En la tabla 15 podemos observar una comparación entre los promedios de los resultados obtenidos en partes por millón (ppm) de los vinos de Arequipa en relación a estudios realizados en vinos muestreados en diferentes partes del Perú (57).

Los resultados obtenidos para Quercetina fueron obtenidos de en una tesis de caracterización polifenólica de vinos en España (53), por otra parte los valores de Ácido Caféico y Acido *p*-Cumarico se encontraron un estudio de determinación de compuestos fenólicos en Italia (58).

Tabla 15. Comparación de Resultados

Procedencia	PROMEDIO (ppm)		
	Ácido Cafeico	Acido <i>p</i> - Cumárico	Quercetina
AREQUIPA	1.50 - 4.65	2.00 - 19.34	6.45- 8.18
VINOS EN EL PERU	0.67 - 15.08	-	0.16 - 3.23
ESPAÑA	12.39 - 46.44	4.73 - 20.43	-
ITALIA	1.39 - 3.27	2.26 - 6.10	3.05 - 13.64

Fuente: Elaboración propia

Los vinos de países europeos demostraron una mayor cantidad en cuanto a los compuestos fenólicos determinados. Especialmente en España debido a que el Ácido

Cafeico, Acido *p*-Cumárico son 12.39-46.44 mg/L y 7.73-20.4 mg/L respectivamente, estos valores son superiores a los encontrados en los vinos de este estudio.

Por otro lado, los vinos de Italia demostraron una cantidad de Quercetina superior con un valor de 3.05 - 13.64 mg/L. En relación a nuestro país se encontró que la cantidad de Ácido Caféico 0.67-15.08 mg/L es superior a los vinos determinados en este estudio. En cuando a Quercetina se encontró valores superiores reportados en otras partes del país.

Los valores de los vinos europeos muestran la superioridad, pudiendo ser: el tratamiento previo de las uvas, el tipo de suelo en el que se cultiva las uvas, el tipo de agua que se utiliza para el riego, el proceso de vinificación y otros factores ambientales y tecnológicos los que repercuten en la concentración de los compuestos fenólicos determinados en este trabajo.

Según el documento Clima y zonificación y tipicidad del vino en regiones vitivinícolas en regiones iberoamericanas explica que la región de Arequipa posee un clima templado y desértico con una temperatura que oscila entre los 26.7°C y 11.7°C, entre los tipos de uva más utilizados destaca la uva Cabernet Sauvignon, Italia, Quebranta, Negra Criolla y Pinot; siendo esta ultima la utilizada para la vinificación de los vinos provenientes de Castilla (54). Estas características ambientales donde se produce, las uvas han sido la base para el desarrollo del análisis de la presente tesis. Al ser un clima desértico y que posee una baja humedad ambiental la zona de investigación no cuenta con los parámetros climatológicos adecuados ya que según Greg Spellman debería tener una temperatura de cultivo promedio de 15°C y una humedad relativamente alta.

Los vinos provenientes de España poseen unos distintos tipos de uvas, entre las que encontramos Albariño, Treixadura y Garnacha. El clima de la provincia Ribeiro es templado, pero con lluvias invernales, con una temperatura suave y elevada pluviometría. El beneficio de este tipo de tipo de clima recae en que al ser el paisaje rocoso y estar en contacto con las lluvias, estas desplazan los macronutrientes de las montañas en dirección a los valles (54). Este proceso natural y ambiental ocasionado por la lluvia es influyente en el aumento de las concentraciones de los compuestos

fenólicos en la uva ya que al nutrir mejor a esta podría generar una mayor concentración en el producto final.

Para los vinos Lambrusco tomados en cuenta para el presente trabajo, existen varios tipos de uva específicamente la usada fue el de tipo Sorbara. Los vinos lambruscos son de la región de Modena-Italia; según el mapa climatológico de Koppen y Geiger esta zona es clasificada como Subcontinental; que se caracteriza por una temperatura anual de 10 a 14 °C, por otra parte se encuentra entre un promedio de lluvia de 751-1000 mm (55). Según Greg Spellman para que exista una buena producción de vino debe de tener una temperatura promedio de 15°C promedio y de lluvia comprendida entre 400 y 800 mm (56). Por lo tanto, los vinos de Modena poseen las características climatológicas necesarias para una buena producción de uva, afectando directamente a su producto final que es el vino.

Es importante recalcar que el vino en la región Arequipa no proviene de un proceso industrializado de tal manera que los procesos de cosecha, vinificación no son medidos rigurosamente bajo parámetros y podría decirse que es un proceso artesanal. Según Castro en los últimos 50 años la industria nacional del vino no ha podido fortalecerse ni desarrollarse en el mercado interno, por otro lado la bebida alcohólica más consumida en el país es la cerveza siendo el consumo anual por persona de 47 L y del vino un 1.5L (59). Por lo expuesto podemos afirmar que, al no existir mucha demanda del producto, la inversión que se le da a la vinificación no es alta por lo que no existe o es muy poca la tecnología específica para este producto como también la materia intelectual.

El método de cromatografía líquida de alto performance (HPLC) descrito en este estudio, permite la identificación y cuantificación de: Ácido Caféico, Ácido *p*-Cumarico y Quercetina simultáneamente en el matriz vino.

Para la validación de los resultados se puso a prueba el método bajo las siguientes características de desempeño: Linealidad, Limite de Detección, Limite de Cuantificación, Precisión y Exactitud. Los resultados fueron positivos y superaron las pruebas a las que se les sometió, probando que el método es capaz de emitir resultados los cuales cuentan con capacidades consistentes con las aplicaciones requeridas, que

en este caso fue la determinación de Ácido Caféico, Ácido *p*-Cumarico y Quercetina simultáneamente.

El método demostró poder emitir resultados confiables a una concentración de: 0 a 26.6 ppm para el Ácido *p*-Cumarico y de 0 a 24.4 ppm para el Ácido Caféico y Quercetina, por consiguiente, los resultados obtenidos dentro de este rango son confiables.

El método utiliza una fase móvil de composición simple lo cual lo hace muy útil para su posterior replica, simplificando así la preparación de las fases móviles y evitando posibles errores en la preparación de estas, lo cual desencadenaría un error futuro en la adquisición de resultados.

En cuanto al tratamiento de la muestra, el método de cromatografía líquida de alto performance (HPLC) demostró que se puede trabajar sin un tratamiento previo y solo se inyectaría directamente previo paso por un filtro 0.45um para evitar el ingreso de alguna partícula que pueda ser perjudicial para el equipo. Al no ser necesario el tratamiento de la muestra evitaría el consumo de reactivos necesarios para un tratamiento de muestra y ahorraría tiempo.

Al ser un método probado para la determinación simultánea de tres compuestos fenólicos este método sería capaz de disminuir el tiempo que se requiere para la adquisición de resultados puesto a que al ser los tres compuestos fenólicos determinados por conjunto se evitaría recurrir a realizar más corridas cromatográficas para determinar cada uno de los compuestos por separado. Al reducir el número de corridas cromatográficas el método sería capaz de disminuir costos de reactivos y material consumible de HPLC, ya que no se tendría que preparar demasiada fase móvil ni utilizar materiales que la fase móvil requiera como filtros de membrana, filtros de jeringa, entre otros.

Por lo expuesto, este método de cromatografía líquida de alto performance (HPLC) podría ser utilizado para el control de calidad de los vinos para las personas que tuvieran el interés de conocer este tipo de información del vino.

CONCLUSIONES

PRIMERO:

Se desarrolló y validó la técnica cromatográfica de HPLC a través de los parámetros: Linealidad, límites de límite de cuantificación y límite de detección, precisión y exactitud para determinar Ácido Caféico, Ácido *p*-Cumarico y Quercetina en vinos de la provincia de Castilla.

SEGUNDO:

Se determinó la cantidad de: Ácido Caféico, Ácido *p*-Cumarico y Quercetina utilizando el método validado de cromatografía líquida de alto desempeño en siete muestras de vino de la provincia de Castilla. Obteniéndose rangos de 1.5 - 4.65 mg L⁻¹ para Ácido Cafeico, 1.32 – 19.34 mg L⁻¹ para Ácido *p*-Cumárico y 5.21 – 8.43 mg L⁻¹ para Quercetina.

TERCERO:

Se analizo las concentraciones obtenidas y se las comparo con vinos provenientes del norte del Perú, como también con vinos de España e Italia pudiendo afirmar que existe superioridad los vinos europeos. Esta diferencia puede darse por la falta de tecnología al realizar la vinificación, deficiencias técnicas al momento de la vinificación y diferencia en el suelo de cultivo. Este problema puede ser ocasionado por la falta de consumo de vino a nivel nacional, por lo tanto, al no haber demanda no se invierte en tecnología ni en personal calificado por parte de los productores.

REFERENCIAS

1. Huertas Vallejos L. Historia de la producción de vinos y piscos en el Perú. *Univers Talca*. 2004;19(2):44-61.
2. NEWTON JL. Determining wine aroma from compositional data. *Aust J Grape Wine Res*. 28 de junio de 2008;11:114-26.
3. Schreier P. Flavor composition of wines: a review. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr*. noviembre de 1979;12(1):59-111.
4. González-Barreiro C, Rial-Otero R, Cancho-Grande B, Simal-Gándara J. Wine aroma compounds in grapes: a critical review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2015;55(2):202-18.
5. Código Internacional de Prácticas Enológicas [Internet]. [citado 4 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.oiv.int/public/medias/4902/code-2016-es.pdf>
6. Diccionario Términos Cata by Mintakeller SL - Issuu [Internet]. [citado 4 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://issuu.com/cataunvino/docs/diccionario-terminos-cata>
7. Enciclopedia de Enología y Vitivinicultura [Internet]. [citado 4 de mayo de 2022]. Disponible en: http://elbibliote.com/resources/books/01_001_040_enologia_terminologia_historia_salud.pdf
8. Dionisio, el dios griego del vino, el teatro y la locura [Internet]. 2019 [citado 4 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.imperivm.org/dionisio-el-dios-griego-del-vino-el-teatro-y-la-locura/>
9. Cooke GM. Making Table Wine at Home. UCANR Publications; 2004. 52 p.
10. Pszczółkowski Tomaszewski P, Ceppi De Lecco C. Manual de Vinificación: Guía práctica para la elaboración de vinos. Primera. Chile: Universidad Católica de Chile; 123 p.
11. Macías Pérez L. Elaboración de vinos. Primera. España: SÍNTESIS, S. A.; 22 p.
12. Bujan J. Guía de la Nueva Cultura del Vino. Primera. España: Viking. S.A.; 2002. 182 p.
13. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. *Bioquímica del Vino*. (176):49.
14. Bakos P. Elaboración de Vino Tinto en la Provincia de Misiones.
15. Preys S, Mazerolles G, Courcoux P, Samson A, Fischer U, Hanafi M, et al. Relationship between polyphenolic composition and some sensory properties in red wines using multiway analyses. *Anal Chim Acta*. 2006;1-2(563):126-36.
16. Prajitna A, Dami IE, Steiner TE, Ferree DC, Scheerens JC, Schwartz SJ. Influence of cluster thinning on phenolic composition, resveratrol, and antioxidant capacity in Chambourcin wine. *Am J Enol Vitic* [Internet]. 2007 [citado 4 de mayo de 2022]; Disponible en: <http://www.ajevonline.org/>
17. Marín FZ. Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos. AMV Ediciones; 2003. 232 p.

18. Schwarz M, Picazo-Bacete JJ, Winterhalter P, Hermosín-Gutiérrez I. Effect of copigments and grape cultivar on the color of red wines fermented after the addition of copigments. *J Agric Food Chem.* 19 de octubre de 2005;53(21):8372-81.
19. Boulton R. The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review. 2001;21.
20. Drewnowski A, Gomez-Carneros C. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *Am J Clin Nutr.* diciembre de 2000;72(6):1424-35.
21. He F, Liang NN, Mu L, Pan QH, Wang J, Reeves MJ, et al. Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Mol Basel Switz.* 7 de febrero de 2012;17(2):1571-601.
22. Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D. *Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine - Stabilization and Treatments.* John Wiley & Sons; 2006. 452 p.
23. Patel RV, Mistry BM, Shinde SK, Syed R, Singh V, Shin HS. Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent. *Eur J Med Chem.* 15 de julio de 2018;155:889-904.
24. Vidal S, Francis I, Williams P, Kwiatkowski M, Gawel R, Cheynier V, et al. The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chem - FOOD CHEM.* 1 de mayo de 2004;85:519-25.
25. Wattenberg LW. Inhibition of carcinogenesis by minor anutrient constituents of the diet. *Proc Nutr Soc.* julio de 1990;49(2):173-83.
26. Mohammadi-Bardbori A, Bengtsson J, Rannug U, Rannug A, Wincent E. Quercetin, resveratrol, and curcumin are indirect activators of the aryl hydrocarbon receptor (AHR). *Chem Res Toxicol.* 17 de septiembre de 2012;25(9):1878-84.
27. Molinelli A, Weiss R, Mizaikoff B. Advanced Solid Phase Extraction Using Molecularly Imprinted Polymers for the Determination of Quercetin in Red Wine. *J Agric Food Chem.* 1 de marzo de 2002;50(7):1804-8.
28. Ansari MA, Abdul HM, Joshi G, Opii WO, Butterfield DA. Protective effect of quercetin in primary neurons against Abeta(1-42): relevance to Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem.* abril de 2009;20(4):269-75.
29. Jeong JH, An JY, Kwon YT, Rhee JG, Lee YJ. Effects of low dose quercetin: Cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. *J Cell Biochem.* 1 de enero de 2009;106(1):73-82.
30. Alam MM, Meerza D, Naseem I. Protective effect of quercetin on hyperglycemia, oxidative stress and DNA damage in alloxan induced type 2 diabetic mice. *Life Sci.* 25 de julio de 2014;109(1):8-14.
31. El-Seedi HR, El-Said AMA, Khalifa SAM, Göransson U, Bohlin L, Borg-Karlson AK, et al. Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *J Agric Food Chem.* 7 de noviembre de 2012;60(44):10877-95.
32. Silva T, Oliveira C, Borges F. Caffeic acid derivatives, analogs and applications: a patent review (2009-2013). *Expert Opin Ther Pat.* noviembre de 2014;24(11):1257-70.

33. Khan F, Bamunuarachchi NI, Tabassum N, Kim YM. Caffeic Acid and Its Derivatives: Antimicrobial Drugs toward Microbial Pathogens. *J Agric Food Chem*. 17 de marzo de 2021;69(10):2979-3004.
34. Darias-Martín J, Martín-Luis B, Carrillo-López M, Lamuela-Raventós R, Díaz-Romero C, Boulton R. Effect of caffeic acid on the color of red wine. *J Agric Food Chem*. 27 de marzo de 2002;50(7):2062-7.
35. Markakis P. *Anthocyanins as Food Colors*. Elsevier; 2012. 280 p.
36. Chris Somers T, Evans ME. Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, "chemical age". *J Sci Food Agric*. 1977;28(3):279-87.
37. Darias-Martín J, Carrillo M, Díaz E, Boulton RB. Enhancement of red wine colour by pre-fermentation addition of copigments. *Food Chem*. 2001;2(73):217-20.
38. Kanimozhi G. Anticancer Effect of Caffeic Acid on Human Cervical Cancer Cells. En: *Coffee in Health and Disease Prevention*. 2015. p. 655-61.
39. Hsu FL, Chen YC, Cheng JT. Caffeic acid as active principle from the fruit of *Xanthium strumarium* to lower plasma glucose in diabetic rats. *Planta Med*. abril de 2000;66(3):228-30.
40. Teixeira J, Gaspar A, Garrido EM, Garrido J, Borges F. Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. *BioMed Res Int*. 2013;2013:251754.
41. Pei K, Ou J, Huang J, Ou S. p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *J Sci Food Agric*. julio de 2016;96(9):2952-62.
42. Shin SY, Han NS, Park YC, Kim MD, Seo JH. Production of resveratrol from p-coumaric acid in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing 4-coumarate:coenzyme A ligase and stilbene synthase genes. *Enzyme Microb Technol*. 5 de enero de 2011;48(1):48-53.
43. Salameh D, Brandam C, Medawar W, Lteif R, Strehaiano P. Highlight on the problems generated by p-coumaric acid analysis in wine fermentations. *Food Chem*. 1 de abril de 2008;107:1661-7.
44. Silva I, Campos FM, Hogg T, Couto JA. Wine phenolic compounds influence the production of volatile phenols by wine-related lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol*. agosto de 2011;111(2):360-70.
45. Ekinci Akdemir FN, Albayrak M, Çalik M, Bayir Y, Gülçin İ. The Protective Effects of p-Coumaric Acid on Acute Liver and Kidney Damages Induced by Cisplatin. *Biomedicines*. junio de 2017;5(2):18.
46. Souza TN, Santos FM, Alves PR, Ferro JN, Correia ACC, Melo TS, et al. Local administration of p-coumaric acid decreases lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice: In vitro and in silico studies. *Eur J Pharmacol*. 15 de abril de 2021;897:173929.
47. Quattrocchi OA, Andrizzi SIA de, Laba RF. *Introducción a la hplc: aplicación y práctica*. Artes Gráficas Farro; 1992. 407 p.
48. Weston A, Brown PR. *HPLC and CE: Principles and Practice*. Academic Press; 1997. 280 p.

49. Nollet LML. Food Analysis by HPLC, Second Edition. CRC Press; 2000. 1074 p.
50. Neue UD. HPLC Columns: Theory, Technology, and Practice. Wiley; 1997. 416 p.
51. Eurolab España. “Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1ª ed. 2016). Disponible en www.eurachem.org”.
52. Duffau B, Rojas F, Guerrero I, Roa L. Validacion de Métodos y determinacion de la incertidumbre de la medición. Soraya Sandoval Sección Metrología Ambiental y de Alimentos Departamento de Salud Ambiental; 2010.
53. Rebolo Lopez S. Estudio de la composicion polifenolica de vinos tintos gallegos. [España]: Universidad de Santiago de Compostela; 2007.
54. Catania C, Uliarte E, Monte RF, Monte S, Bruno L, Molina J, et al. Clima, zonificación y tipicidad del vino en regiones vitivinícolas Iberoamericanas. 1 de enero de 2012;
55. Simona F, Acquavota F. The Climate of Italy. En 2017. p. 29-38.
56. Spellman G. Wine, weather and climate. Weather. agosto de 1999;54(8):230-9.
57. Salazar R, Espinoza G, Ruiz C, Fernández M de F, Rojas R. Compuestos fenólicos, actividad antioxidante, contenido de resveratrol y componentes del aroma de 8 vinos peruanos. Rev Soc Quím Perú. abril de 2011;77(2):135-43.
58. Salvatore E, Cocchi M, Marchetti A, Marini F, De Juan A. Determination of phenolic compounds and authentication of PDO Lambrusco wines by HPLC-DAD and chemometric techniques. Anal Chim Acta. 25 de enero de 2013;761:34-45.
59. Castro Barreda Ma del P. EL CONSUMO DE VINO Y LA PROMOCIÓN DEL ENOTURISMO EN EL PERÚ, 2019 [Internet]. [Peru]: Universidad San Martin de Porres; 2020 [citado 23 de julio de 2022]. Disponible en: https://repositorio.usmp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12727/7543/CASTRO_BM.pdf?sequence=4&isAllowed=y

ANEXOS

ANEXO 1

TABLA T-STUDENT

Grados de libertad	0.25	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005
1	1.0000	3.0777	6.3137	12.7062	31.8210	63.6559
2	0.8165	1.8856	2.9200	4.3027	6.9645	9.9250
3	0.7649	1.6377	2.3534	3.1824	4.5407	5.8408
4	0.7407	1.5332	2.1318	2.7765	3.7469	4.6041
5	0.7267	1.4759	2.0150	2.5706	3.3649	4.0321
6	0.7176	1.4398	1.9432	2.4469	3.1427	3.7074
7	0.7111	1.4149	1.8946	2.3646	2.9979	3.4995
8	0.7064	1.3968	1.8595	2.3060	2.8965	3.3554
9	0.7027	1.3830	1.8331	2.2622	2.8214	3.2498
10	0.6998	1.3722	1.8125	2.2281	2.7638	3.1693
11	0.6974	1.3634	1.7959	2.2010	2.7181	3.1058
12	0.6955	1.3562	1.7823	2.1788	2.6810	3.0545
13	0.6938	1.3502	1.7709	2.1604	2.6503	3.0123
14	0.6924	1.3450	1.7613	2.1448	2.6245	2.9768
15	0.6912	1.3406	1.7531	2.1315	2.6025	2.9467
16	0.6901	1.3368	1.7459	2.1199	2.5835	2.9208
17	0.6892	1.3334	1.7396	2.1098	2.5669	2.8982
18	0.6884	1.3304	1.7341	2.1009	2.5524	2.8784
19	0.6876	1.3277	1.7291	2.0930	2.5395	2.8609
20	0.6870	1.3253	1.7247	2.0860	2.5280	2.8453
21	0.6864	1.3232	1.7207	2.0796	2.5176	2.8314
22	0.6858	1.3212	1.7171	2.0739	2.5083	2.8188
23	0.6853	1.3195	1.7139	2.0687	2.4999	2.8073
24	0.6848	1.3178	1.7109	2.0639	2.4922	2.7970
25	0.6844	1.3163	1.7081	2.0595	2.4851	2.7874
26	0.6840	1.3150	1.7056	2.0555	2.4786	2.7787
27	0.6837	1.3137	1.7033	2.0518	2.4727	2.7707
28	0.6834	1.3125	1.7011	2.0484	2.4671	2.7633
29	0.6830	1.3114	1.6991	2.0452	2.4620	2.7564
30	0.6828	1.3104	1.6973	2.0423	2.4573	2.7500
31	0.6825	1.3095	1.6955	2.0395	2.4528	2.7440
32	0.6822	1.3086	1.6939	2.0369	2.4487	2.7385
33	0.6820	1.3077	1.6924	2.0345	2.4448	2.7333
34	0.6818	1.3070	1.6909	2.0322	2.4411	2.7284
35	0.6816	1.3062	1.6896	2.0301	2.4377	2.7238
36	0.6814	1.3055	1.6883	2.0281	2.4345	2.7195
37	0.6812	1.3049	1.6871	2.0262	2.4314	2.7154
38	0.6810	1.3042	1.6860	2.0244	2.4286	2.7116
39	0.6808	1.3036	1.6849	2.0227	2.4258	2.7079
40	0.6807	1.3031	1.6839	2.0211	2.4233	2.7045
41	0.6805	1.3025	1.6829	2.0195	2.4208	2.7012
42	0.6804	1.3020	1.6820	2.0181	2.4185	2.6981
43	0.6802	1.3016	1.6811	2.0167	2.4163	2.6951
44	0.6801	1.3011	1.6802	2.0154	2.4141	2.6923

