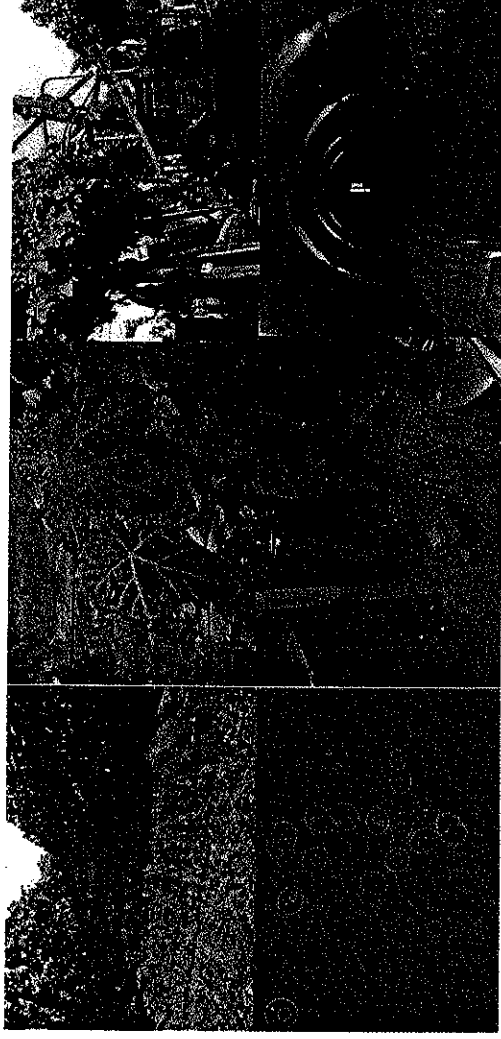
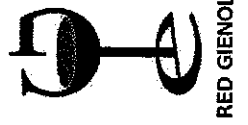


# Nuevas perspectivas en Investigación vitivinícola



**Editores**  
Fernando Calderón Fernández  
Felipe Palomero Rodríguez  
José Antonio Suárez-Lepe



RED GIENOL

ISBN: 978-84-96709-13-3

AMV Ediciones

Calle Almansa, 94, 28040-Madrid

Teléfono: 915336926

Fax: 915530286

Correo: [amadrid@amvediciones.com](mailto:amadrid@amvediciones.com)

Internet: [www.amvediciones.com](http://www.amvediciones.com) y [www.amvediciones.es](http://www.amvediciones.es)



AMV EDICIONES

## Desarrollo de un procedimiento eficaz para el análisis rutinario de la actividad antioxidante de muestras vínicas a partir del método DPPH.

Rolanda Carmona Jiménez<sup>1</sup>, M. Valme García Moreno<sup>1\*</sup>, José M. Igartuburu<sup>2</sup>, Carmelo García Barroso<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química Analítica, Centro Andaluz de Investigaciones Vitivinícolas, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), Universidad de Cádiz. Campus Universitario de Puerto Real, 11510 Puerto Real, Cádiz, España.  
Teléfono: 956 016456, correo electrónico: [valme.garcia@uca.es](mailto:valme.garcia@uca.es)

<sup>2</sup>Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz. Campus Universitario de Puerto Real, 11510 Puerto Real, Cádiz, España.

La determinación de la actividad antioxidante en alimentos en general, y en el vino en particular, es un procedimiento que presenta mayor interés. Este parámetro está directamente relacionado con la composición en compuestos antioxidantes de los alimentos, cuyo consumo presenta diversos efectos beneficiosos para la salud.

Uno de los métodos más utilizados para la determinación de dicha actividad es el que emplea el radical DPPH. A pesar de ser considerado un método sencillo y económico, la laboriosidad de su ejecución lo hace inviable cuando el número de muestras a analizar es elevado. Así mismo, la falta de estandarización del procedimiento, como bien apuntan diversos autores, dificulta la interpretación de los resultados.

Con la finalidad de establecer un procedimiento que pueda ser utilizado de forma rutinaria, se ha realizado un estudio del grado de linealidad existente entre la concentración de muestras vínicas y la inhibición del radical DPPH, así como estudios de los efectos de la reacción. La determinación de una zona lineal común para todas las muestras, un tiempo fijo de reacción adecuado, la expresión de los resultados en un nuevo parámetro, el Ec20, nos ha permitido desarrollar un procedimiento de medida sencillo y fiable, con resultados sin errores significativos, y adecuado para la realización de análisis de rutina de muestras de vino.

**Palabras clave:** Actividad antioxidante, DPPH, vino

### Introducción

Estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que el consumo moderado de vino, especialmente de vino tinto, reduce la incidencia de diversas enfermedades tales como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer, etc. Se ha confirmado que son los compuestos polifenólicos presentes en el vino los responsables de estos efectos beneficiosos para la salud. La actividad biológica de estos compuestos está relacionada con su gran capacidad para atrapar radicales libres, es decir, con su capacidad de actuar como antioxidantes, disminuyendo el estrés oxidativo celular y la enfermedad asociadas con éste [1,2]. Por tanto, resulta de gran interés poder determinar la capacidad o actividad antioxidante de los alimentos en general, y de los vinos en particular.

Han sido diversos los métodos desarrollados para la determinación de la actividad antioxidante. Uno de los métodos más empleado es el que utiliza el radical DPPH, por ser considerado un método simple, económico y barato. El DPPH es un radical libre estable, que debido a su particular estructura mantiene localizado el electrón desapareado por toda la molécula, sin que tienda a dimerizar. Presenta un intenso color violeta y una banda de absorción entre 515-520 nm. En presencia de compuestos antioxidantes puede perder un electrón o un átomo de hidrógeno del compuesto antioxidante, obteniéndose entonces la forma reducida del DPPH que es de color amarillo pálido. La actividad antioxidante puede determinarse espectrofotométricamente en función del grado de decoloración de la mezcla. Cuanto menor sea la

absorbancia más se habrá reducido el DPPH y por tanto, más capacidad antioxidante tendrá la muestra. El resultado es normalmente expresado a través del parámetro conocido como concentración eficiente o  $EC_{50}$ , un parámetro muy adecuado para poder comparar resultados ya que es independiente de la concentración de muestra, y que es definido como la cantidad de muestra necesaria para disminuir el 50% de la cantidad inicial de DPPH.

Este método, aun cuando es considerado como simple y eficiente, presenta varias limitaciones que complican su ejecución. Un hecho importante a señalar, es que evidencias experimentales han demostrado una relación no lineal entre la concentración de antioxidante y la actividad antiradicalaria [3 - 5]. Esto significa que para poder determinar el  $EC_{50}$ , se han de estudiar alícuotas de la muestra de distintas concentraciones y representar en una gráfica el porcentaje de DPPH residual o inhibido frente a la cantidad de muestra en relación a la cantidad de DPPH inicial. De esta gráfica se obtiene el  $EC_{50}$  por interpolación. Como consecuencia aparecen varios inconvenientes. En primer lugar, es usual, especialmente analizando muestras complejas, que las curvas no presenten buenos ajustes, por lo que los resultados pueden ir unidos a errores significativos. En segundo lugar, el análisis de cada muestra implica analizar al menos cinco o seis alícuotas, normalmente duplicado o triplicado. Esto significa que cuando el número de muestras a analizar es grande, el método puede resultar no viable desde un punto de vista operativo.

Otro aspecto que limita la ejecución del procedimiento está relacionado con el tiempo de medida. Diversos autores han probado la importancia de medir hasta que la reacción ha finalizado por completo. Es decir, hasta un estado de estabilidad en cuanto a la absorbancia, para no infravalorar el resultado. El tiempo necesario para alcanzar la estabilidad depende de la naturaleza de los antioxidantes y no es lineal con la concentración. Por tanto, en principio, es necesario estudiar la cinética de cada alícuota, lo que puede conllevar largos tiempos de medida.

En el presente trabajo, basándonos en los comentarios realizados por algunos autores sobre la existencia de cierta linealidad entre la concentración de muestra y el porcentaje de inhibición del DPPH para un limitado rango de concentración [3, 4], se ha realizado un estudio del rango de linealidad para muestras vínicas, así como estudios cinéticos de la reacción. El objetivo de este estudio ha sido establecer un procedimiento de medida sencillo y funcional que pueda ser utilizado para realizar análisis de rutina, utilizando la zona lineal entre la concentración de la muestra y el porcentaje de inhibición del DPPH.

## 2. Material y Métodos

**Muestras.** Se han estudiado tres compuestos fenólicos estándar, cuatro tipos de vino y un vinagre. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

**Compuestos polifenólicos:** se seleccionaron tres compuestos fenólicos estándar para su análisis: ácido galico, ácido cafeico y catequina, como ejemplo de un ácido hidroxibenzoico, ácido hidroxicinámico y flavono respectivamente, todos usualmente presentes en vinos. Se prepararon distintas concentraciones en agua.

**Vinos y vinagre:** Los vinos estudiados fueron dos vinos blancos, un vino joven y una manzanilla, dos tintos, uno joven y uno con crianza, y un vinagre de Jerez, todos procedentes de la provincia de Cádiz. Las muestras fueron diluidas a distintas concentraciones con agua. Es usual que las muestras de vinos y vinagre puedan presentar fenómenos de precipitación al aumentar la proporción de alcohol. Esto podría darse cuando la muestra es mezclada con el medio alcohólico del DPPH. No obstante, al haber sido diluidas previamente con agua, no se han observado fenómenos de precipitación en ningún caso.

**Método.** La determinación de la actividad antioxidante fue realizada de acuerdo al método propuesto por Brand-Williams y colaboradores (1995) con algunas modificaciones. De cada una de las muestras

...xidante tendrá la misma...  
 ...ncentraci3n eficiente...  
 ...diente de la concentraci3n...  
 ...r el 50% de la cantidad...

...senta varias limitaciones...  
 ...erimentales han demostrado...  
 ...ficialaria [3 - 5]. Esto...  
 ...e distintas concentraciones...  
 ...cantidad de muestra...  
 ...como consecuencia...  
 ...muestras complejas...  
 ...a errores significativos...  
 ...alícuotas, normalmente...  
 ...analizar es grande, el...

...con el tiempo de...  
 ...realizado por completo...  
 ...infravalorar el resultado...  
 ...oxidantes y no es...  
 ...ada alícuota, lo que...

...algunos autores sobre...  
 ...le inhibici3n del DPPH...  
 ...l rango de linealidad...  
 ...tudío ha sido establecido...  
 ...análisis de rutina...  
 ...DPPH.

...no y un vinagre. Todos...

...a su análisis: ácido...  
 ...hidroxicinámico y...  
 ...concentraciones en agua...  
 ...na manzanilla, dos...  
 ...a provincia de Cádiz...  
 ...estras de vinos y...  
 ...Esto podría darse...  
 ...sido diluidas...

...al método propuesto...  
 ...ina de las muestras...

...analizaron diez alícuotas de distintas concentraciones. A 200 µl de muestra o etanol (en el caso del blanco) se le añadió 3,3 ml de una disolución etanólica de DPPH 10<sup>-4</sup> M preparada diariamente. La concentración de DPPH inicial fue obtenida espectrofotométricamente a partir de su curva de calibrado:  $y = 0,0286 [DPPH] + 0,004$ ;  $r^2 = 0,9999$ ; donde la concentración de DPPH está expresada en ppm. La absorbancia se midió a 515 nm con un espectrofotómetro modelo Cary 50 Bio (Varian, Australia) cada 10 minutos hasta lograr una medida estable. La temperatura de las muestras se mantuvo a 20° C mediante un sistema termostático (Frígitem, P-Selecta, España). Para cada una de las alícuotas fue calculado su porcentaje de inhibición, una vez alcanzada la estabilidad, siguiendo la siguiente ecuación:

$$I\% = (\text{Abs blanco} - \text{Abs muestra}) / \text{Abs blanco} \times 100 \quad (1)$$

...los porcentajes de inhibición obtenidos para cada alícuota fueron representados en una gráfica frente a la concentración de cada una de esas alícuotas dividido por la concentración inicial de DPPH.

### Resultados y Conclusiones

En el estudio del porcentaje de inhibición del DPPH frente a la concentración de muestra, encontramos que cada muestra presenta un comportamiento antirradicalario muy distinto. Se confirma la existencia de cierta linealidad entre la concentración de muestra y el porcentaje de inhibición, si bien el rango de linealidad varía mucho en función del tipo de muestra, como puede verse en el ejemplo de la fig. 1. Mientras que los compuestos fenólicos estándar presentan un rango de linealidad por debajo del 80% de inhibición, los vinos blancos y el tinto crianza solo presentan linealidad por debajo de 40% de inhibición. El vino tinto joven es lineal por debajo del 60% y el vinagre de Jerez por debajo del 50% de inhibición. Basándonos en estos resultados, podemos establecer que todas las muestras analizadas presentan, al menos, un rango común de linealidad por debajo del 40% de inhibición del DPPH.

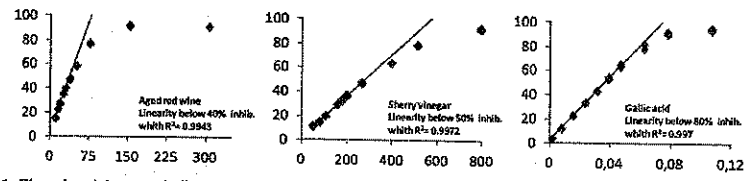


Figura 1. Ejemplos del rango de linealidad. Se representa en ordenada el % de inhibición del DPPH frente a la concentración de muestra dividida por la concentración de DPPH inicial.

Trabajar en el rango de linealidad conlleva la ventaja de permitir reducir el número de alícuotas a analizar para obtener la curva, %inhibición-cantidad de muestra, sin errores significativos. No obstante, para asegurar que estamos en la zona lineal, tendremos que trabajar con porcentajes de inhibición por debajo del 40%, lo que significa que no se puede expresar el resultado a través del parámetro  $Ec_{50}$ . Por analogía a esta medida, sugerimos expresar el resultado como  $Ec_{20}$ : cantidad de muestra necesaria para disminuir el DPPH inicial el 20% []. El 20% de inhibición está justo en el centro de la zona lineal mínima, por lo que puede ser obtenido de forma más sencilla y fidedigna. Del análisis de los resultados se ha concluido que es posible obtener el  $Ec_{20}$  a partir de un ajuste lineal hecho solo con dos puntos (por triplicado), sin obtener errores significativos, a condición de que uno de los puntos presente una inhibición por debajo del 20% y el otro esté entre el 20-40% de inhibición, con la finalidad de minimizar el error. La tabla 1 muestra el  $Ec_{20}$  obtenido en la zona lineal con varios puntos por triplicado y el obtenido con sólo dos puntos por triplicado siguiendo la condición mencionada. Del análisis estadístico obtenemos que no hay errores significativos para un criterio de significación de  $p < 0,05$ .

Tabla 1. Comparativa de  $EC_{20}$  obtenido, en la zona lineal, a partir de varios puntos y el obtenido a partir de dos puntos.

SAMPLES	n	LINEAL	$R^2$	$EC_{20} \pm DS$	n	LINEAL	$R^2$	$EC_{20} \pm DS$	ERROR
		ADJUSTMENT				ADJUSTMENT			
White wine	8	$y=0.0512x-2.4985$	0.9972	$439.83 \pm 10.75$	2	$y=0.0509x-2.0539$	0.9995	$433.33 \pm 7.02$	1.48
Sherry wine	8	$y=0.0540x+1.4135$	0.9968	$344.27 \pm 11.18$	2	$y=0.0485x+3.0485$	0.9991	$349.80 \pm 5.69$	1.58
Young red wine	5	$y=1.1738x+3.0071$	0.9960	$14.48 \pm 0.52$	2	$y=1.2080x+1.8779$	0.9994	$14.91 \pm 0.26$	2.22
Aged red wine	5	$y=1.2187x+3.8978$	0.9943	$13.21 \pm 0.62$	2	$y=1.3042x+2.3435$	0.9994	$13.54 \pm 0.25$	2.46
Sherry vinegar	6	$y=0.1758x+1.6565$	0.9965	$104.34 \pm 3.43$	2	$y=0.1810x+0.6500$	0.9985	$106.92 \pm 2.03$	2.47
Gallic acid	5	$y=1333.4x+2.0191$	0.9993	$0.0135 \pm 0.0003$	2	$y=1354.64x+1.7684$	0.9997	$0.0134 \pm 0.00017$	0.37
Caffeic acid	5	$y=559.51x+0.7908$	0.999	$0.0343 \pm 0.0008$	2	$y=545.06x+1.5161$	0.9987	$0.0339 \pm 0.00076$	0.23
Catechin	5	$y=402.79x+4.6943$	0.9974	$0.0380 \pm 0.0018$	2	$y=403.37x+4.9414$	0.9987	$0.0373 \pm 0.00073$	0.28

En cuanto al estudio cinético realizado, se ha obtenido que los tiempos necesarios para alcanzar estabilidad dependen de la muestra analizada y de su concentración. Los tiempos de reacción de muestras de vino y vinagre alcanzan los 300 minutos para la mayoría de las alícuotas, mientras que compuestos fenólicos estudiados presentan tiempos que van desde los 30 minutos a los 240 minutos. Aunque ya ha sido mencionada la importancia de medir en el estado de estabilidad, también se ha considerado que esto requiere de largos tiempos de medida y se imposibilita poder medir muchas muestras a la vez. Por lo consiguiente, para tener un método de medida funcional, hemos de descartar la necesidad de hacer estudios cinéticos, seleccionando un tiempo de medida fijo que no implique errores significativos en la medida. En este estudio de todos los tiempos de reacción de las alícuotas analizadas con porcentajes de inhibición del DPPH por debajo del 40%, y considerando el mínimo tiempo de espera con el menor error en los resultados, ha sido estimado un tiempo adecuado de medida de 240 minutos. Midiendo a 240 minutos, las muestras presentan errores por debajo del 5%, a excepción del vino blanco que presentan un error relativo del 5,8%.

Como conclusión podemos decir que trabajando con concentraciones de muestra que producen porcentajes de inhibición del DPPH por debajo del 40%, aseguramos que estamos trabajando en una zona lineal. Esto nos permite simplificar el procedimiento, necesitando analizar sólo dos alícuotas por muestra para expresar el resultado en un nuevo parámetro más adecuado, el  $EC_{20}$ . A su vez, se ha demostrado que es posible medir, para muestras de origen vínico, a un tiempo fijo de 240 minutos, sin obtener errores significativos, evitando así la necesidad de hacer estudios cinéticos. Todas estas consideraciones permiten modificar el método haciéndolo más práctico y funcional, posibilitando su uso como método de análisis de rutina.

#### 4. Bibliografía

- [1] Baoshan, S.; Spranger, I.; Yang, J.; Leandro, C.; Guo, L.; Canário, S.; Zhao, Y. & Chunfu, W. 2009. Red wine polyphenol complexes and their in vitro antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 57, 8623-8627.
- [2] Šeruga, M.; Novak, I. & Jakobek, L. 2011. Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chem.* 124, 1208-1216.
- [3] Villaño, D.; Fernández-Pachón, M.S.; Troncoso, A.M. & García-Parrilla, M.C. 2005. Comparison of antioxidant activity of phenolic compounds and metabolites in vitro. *Anal. Chim. Acta* 538, 391-398.
- [4] Locatelli, M.; Gindro, R.; Travaglia, F.; Coisson, J.D.; Rinaldi, M. & Artorio, M. 2009. Study of the DPPH-scavenging activity. Development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chem.* 114, 889-897.
- [5] Chen, Z.; Bertin, R. & Froidi, G. 2013.  $EC_{50}$  estimation of antioxidant activity in DPPH<sup>•</sup> assay using several statistical procedures. *Food Chem* 138, 414-420.
- [6] Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E. & Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28, 25-30.
- [7] Mishra, K.; Ojha, H. & Chaudhury, N.K. 2012. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH<sup>•</sup> assay: A review and results. *Food Chem.* 130, 1036-1043.
- [8] Carmona Jiménez, Y.; García-Moreno, M.V.; Igartuburu, J.M. & García Barroso, C. Simplification of DPPH assay for estimation of the antioxidant activity of wine and wine by-products. *J. Agric. Food Chem. Enviado-marzo 2013.*