



La Santiago
transforma
tu mundo



**CUANTIFICACION POR HPLC DE TRANS-RESVERATROL EN LA
UVA ISABELLA (*Vitis labrusca*) CULTIVADAS EN LA UNION-
VALLE DEL CAUCA**

Stephanie Ospina Ramírez

DIRECTOR
Jorge Enrique Castillo A. M.Sc.

Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas,
Programa de Química
Cali, Colombia
2019



La Santiago
transforma
tu mundo



**CUANTIFICACION POR HPLC DE TRANS-RESVERATROL EN LA
UVA ISABELLA (*Vitis labrusca*) CULTIVADAS EN LA UNION-
VALLE DEL CAUCA**

Stephanie Ospina Ramírez

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
Química

DIRECTOR
Jorge Enrique Castillo A. M.Sc.

Línea de Investigación:
Evaluación Química y Biológica de plantas medicinales tropicales
Grupo de Investigación:
GIEMA

Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas,
Programa de Química
Ciudad, Colombia
2019



La Santiago
transforma
tu mundo



DEDICATORIA

Alcanzar esta meta que un día me trace en mi vida, me hace sentir honrada y llena de satisfacción, por tal motivo y con mucha alegría quiero dedicar este trabajo primeramente a Dios, por permitirme llegar hasta este momento tan especial en mi vida, porque me ha dado fortaleza para continuar a pesar de los obstáculos, y es a él a quien debo lo que soy ahora.

A mis padres por siempre apoyarme, por la paciencia durante todo este trayecto y por ser mi cimiento para la construcción de mí crecimiento personal y profesional, porque son ellos quien han velado por alcanzar esta meta que hoy cumpla, gracias a ellos por sus consejos que han sabido guiarme de manera correcta para culminar mi carrera y por siempre estar ahí a pesar de cualquier situación. A mi hermana que siempre estuvo ahí para brindarme ánimo y apoyo en cada momento, y al resto de mi familia porque de una forma u otra siempre me apoyaron para seguir adelante.

A mis amigas Yuly Andrea Toro, Carol Martán y Tatiana Gonzales, quienes sin esperar nada a cambio estuvieron siempre ahí, alentándome en cada caída, en las alegrías en las tristezas, que, a pesar de las situaciones difíciles y los momentos más duros, estuvieron a mi lado apoyándome con cada palabra de aliento y empuje. Simplemente gracias por creer que si era posible que este sueño se hiciera realidad.



La Santiago
transforma
tu mundo



AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han contribuido al proceso y conclusión de este trabajo. En primer lugar, quiero agradecer a Dios, porque su amor y su bondad no tienen fin, permitiéndome sonreír ante todos mis logros que son resultado de su ayuda y que es gracias a él que esta meta hoy está cumplida.

Gracias a mis padres por ser los principales promotores de mis sueños, gracias por cada día confiar y creer en mí y en mis expectativas, y por acompañarme en este largo proceso; agradezco a mi director de trabajo de grado y maestro de estudio en parte de mi carrera, por creer en este proyecto y apoyarme de manera personal e institucional para concluir esta investigación.

Por último, a mis amigos porque de una u otra manera me aportaron bastante, brindándome su ayuda y motivación. No fue sencillo el camino hasta aquí, pero gracias a cada uno de sus aportes, a su amor a su paciencia y su bondad, hoy lograr esta meta fue mucho más fácil, de nuevo muchas gracias.



IMPACTOS

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico	Cuantificación de Trans-resveratrol que puede ser usado para el desarrollo de cosméticos. uso de equipos y materiales para el desarrollo experimental. Muestreo del Compuesto de interés en la unión – Valle	Toda la Comunidad sobre todo las mujeres
Responsabilidad social	Compromiso al desarrollo de alternativas que generen más beneficios mejorando la calidad de productos y servicios tanto para la salud como para el medio ambiente.	Toda la Comunidad
Científico	Cuantificación del compuesto Trans-resveratrol sus efectos biológicos, como pueden llegar a desarrollar beneficios en el ámbito médico y cómo influyen factores como la temperatura en la determinación de la concentración.	Investigadores, científicos, Químicos y profesionales en ciencias Básicas
Indicadores de Gestión	Desarrollar técnicas experimentales para la extracción del compuesto y ofrecer precios accesibles que satisfagan las necesidades del cliente y que al mismo tiempo produzcan un margen razonable de utilidad	Toda la comunidad interesada
Tecnológico	Uso de Equipos aplicando la utilidad del compuesto. Implementación de procesos eficaces para la determinación del Trans-resveratrol	Investigadores, científicos, Químicos y profesionales en ciencias Básicas
Técnico	Uso de técnicas como la Cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC), de equipos como el rotaevaporador, y técnicas experimentales de extracción del compuesto.	Analistas, Investigadores, científicos, Químicos y profesionales de interés
Ambiental	Aprovechamiento de la tierra como factor primario. Uso de los recursos naturales. Los efectos producidos no llegan a ser nocivos.	Agricultores y Medio Ambiente
Social	Contribuir con cambios positivos y sostenibles en beneficio de la sociedad, abordando los orígenes de la investigación para proponer formas de desarrollo del compuesto.	Investigadores, científicos, Químicos y profesionales en ciencias Básicas y personas interesadas
Cultural	Generar la aparición de una cultura enfocada en trabajar con el Resveratrol, presentando procesos que perfilen un alcance general que cumpla con las expectativas de cada persona.	Toda la comunidad interesada



CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
2. JUSTIFICACIÓN	4
3. OBJETIVOS	5
4. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	6
4.1 Origen del Cultivo de Uva en Colombia	6
4.2 Taxonomía	7
4.2.1 Fruto	8
4.3 Influencia del pH y Temperatura	9
4.4 Compuestos Fenólicos	10
4.5 Solubilidad	11
4.6 Efectos Biologicos del Resveratrol	11
4.7 Métodos de Análisis del Resveratrol	12
5. METODOLOGÍA PROPUESTA	13
5.1 PROCEDIMIENTO	13
5.1.1 Materia Prima	13
5.1.2 Secado	13
5.1.3 Extracción	13
5.1.4 Purificación	13
5.1.5 Análisis Cromatográfico	13
5.2 PARAMETROS DE EVALUACION DEL METODO ANALITICO	14
5.2.1 Determinación del Rango Lineal	14
5.2.2 Curvas de altas, medias y bajas concentraciones	14



5.2.3	Precisión	14
5.2.4	Exactitud	14
5.2.5	Evaluación de Estabilidad de Estándares.....	15
5.3	ANÁLISIS DE MUESTRAS	15
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
6.1	Determinación del rango lineal	16
6.2	Curvas de calibración de altas, medias y bajas concentraciones	18
6.2.1	Curva Rango Alto	19
6.2.2	Curva Rango Medio.....	20
6.2.2.1	Evaluación de la presencia de interferencia de matriz	20
6.2.3	Curva Rango Bajo	23
6.2.3.1	Límite de Detección y Cuantificación del Instrumento	24
6.2.3.2	Límite de Detección y Cuantificación del Método.....	25
6.3	Precisión	26
6.3.1	Precisión del Instrumento	26
6.3.2	Precisión por Día	27
6.3.3	Precisión por Muestra.....	28
6.4	Exactitud	16
6.5	Estabilidad de Estándares.....	30
6.6	ANÁLISIS DE MUESTRAS	31
7.	CONCLUSIONES	35
8.	BIBLIOGRAFÍA	37
9.	ANEXOS	39



LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Estructura Química del Trans-resveratrol.....	7
Figura 2: Frutos de la Uva Isabella (<i>Vitis labrusca</i>).	8
Figura 3: Isomerización del Trans-Resveratrol a la forma Cis.....	9
Figura 4: Mapa Satelital de la ubicación de la casa Grajales.	32
Figura 5: Cromatograma de la Solucion Estandar de Trans-resveratrol.....	40
Figura 6: Cromatograma de la Muestra Dopada.	41
Figura 7: Cromatograma de la Muestras de Uva Isabella (<i>Vitis labrusca</i>)..... analizadas	41



LISTA DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1: Curva de Calibración de Determinación de Rango Lineal.....	16
Gráfica 2: Determinación del Rango Lineal de area vs concentración.....	17
Gráfica 3: Curva de Calibración Rango Alto.....	19
Gráfica 4: Curva de Calibración Rango Medio.....	20
Gráfica 5: Curvas Rango Medio y de Adición estándar para la evaluación de Interferencias de matriz.....	21
Gráfica 6: Curva de Calibración Rango Bajo.....	23



LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Estadísticos para la regresion lineal de la curva de calibración	17
Tabla 2: Contraste estadístico para el Coeficiente de Correlación.....	18
Tabla 3: Resultados obtenidos en la curva de calibración Rango Alto.....	19
Tabla 4: Resultados obtenidos en la curva de calibración Rango Medio	20
Tabla 5: Contraste de comparación entre la desviación estandar de la curva de calibración rango medio y de adición estándar	22
Tabla 6: Contraste de significación entre las pendientes de las curvas de calibración rango medio y de adición estándar	23
Tabla 7: Resultados obtenidos en la curva de calibración Rango Bajo.....	24
Tabla 8: Estadísticos de regresión para el cálculo del Límite de Detección y Cuantificación.....	24
Tabla 9: Resultados de Análisis de Precisión del Instrumento.....	26
Tabla 10: Repetibilidad y Reproducibilidad para estándares 5,10 y 20 mg/L.27	
Tabla 11: Resultados precisión por muestra	28
Tabla 12: Porcentajes de Recuperación para el análisis de Exactitud.....	30
Tabla 13: Resultados análisis de estabilidad de patrón por semana.....	30
Tabla 14: Resultados de análisis de varianza del estándar de 10 mg/L leído durante 4 semanas.....	31
Tabla 15: Concentración de Trans-resveratrol en la Uva Isabella (<i>Vitis labrusca</i>) obtenidos en el muestreo realizado en la Unión–Valle del Cauca.	32



RESUMEN

La uva Isabella (*Vitis labrusca*) es una variedad que se ha adaptado óptimamente a las condiciones climáticas de La Unión-Valle del Cauca, y ha tenido buena aceptación en los mercados locales. Actualmente la uva se consume en fresco y se desconoce su contenido fenólico. De acuerdo con estudios epidemiológicos, la presencia de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante como el trans-resveratrol, puede ejercer un efecto protector contra algunas enfermedades tales como el cáncer y trastornos cardiovasculares. Por tal motivo, con este trabajo se realiza la cuantificación del trans-resveratrol presente en los epicarpios de la uva Isabella (*Vitis labrusca*) cultivadas en La Unión-Valle del Cauca, mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detector ultravioleta. Se asegurará que el método a seguir cumpla con los parámetros de evaluación (linealidad, precisión y exactitud). También se pretende contribuir a una propuesta metodológica para la extracción (líquido-líquido con metanol acidificado) y purificación del trans-resveratrol.

Palabras clave: Trans-Resveratrol, *Vitis labrusca*, Cuantificación, HPLC



ABSTRACT

The Isabella grape (*Vitis labrusca*) is a variety that has adapted optimally to the climatic conditions of La Unión-Valle del Cauca and has had a good acceptance in local markets. At the moment the grape is consumed fresh and its phenolic content is unknown. According to epidemiological studies, the presence of bioactive compounds with antioxidant capacity, such as trans-resveratrol, may have a protective effect against certain diseases such as cancer and cardiovascular disorders. For this reason, this work involves the quantification of trans-resveratrol present in the epicarps of the Isabella grape (*Vitis labrusca*) grown in La Unión-Valle del Cauca, using high performance liquid chromatography (HPLC) with an ultraviolet detector. It will be ensured that the method to be followed complies with the evaluation parameters (linearity, precision and accuracy). A methodological proposal for extraction (liquid-liquid with acidified methanol) and purification of trans-resveratrol is also intended.

Keywords: Trans-Resveratrol, *Vitis labrusca*, Quantification, HPLC



1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Colombia la uva se produce durante todo el año. La Unión-Valle de Cauca, es uno de los municipios que reúne excepcionales condiciones de suelo y clima para su cultivo, ya que cuenta con diversos viñedos de las más finas cepas, como lo son las tintas (negra y roja).

En 1940 se descubrió la existencia del resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno), compuesto fenólico que se encuentra principalmente en la piel de las uvas. Numerosos estudios epidemiológicos le atribuyen actividades tales como antifúngico, bactericida, antioxidante, antiinflamatorio, antimutágeno y actividad quimiopreventiva de la carcinogénesis.

Debido a estos grandes beneficios, en la actualidad se realiza la cuantificación de resveratrol en uvas y vinos por técnicas separativas, fundamentalmente cromatografía líquida de alta eficacia, cromatografía de gases y electroforesis capilar en países tales como España, Italia, Francia, Chile, Estados Unidos, Argentina, Venezuela, Canadá, entre otros.

De acuerdo a lo anterior, es necesaria la realización de estudios en Colombia para darle respuesta al interrogante ¿Cuál es el contenido de trans-resveratrol en la uva Isabella (*Vitis labrusca*) cultivada específicamente en la Unión-Valle del Cauca?



2. JUSTIFICACIÓN

La producción de uva, una actividad agrícola que se realiza desde hace mucho tiempo en casi todo el mundo, posee como tradicionales productores y exportadores a los países europeos; no obstante, en los últimos años se ha observado un aumento en la producción de uva en Colombia; donde para el 2009 la producción mundial fue de 66.935.199 ton cultivadas en 7.437.141 hectáreas, de las cuales Colombia tenía sembradas 2.581 hectáreas.

Con cifras como las que se acaban de mencionar, y dado que ha aumentado considerablemente la preocupación por una dieta que permita prevenir efectos nocivos inherentes a la vida; es de notable importancia determinar el contenido de trans-resveratrol en los epicarpios de la uva cultivada en La Unión-Valle que aporte información a la comunidad acerca de los grandes beneficios que trae el consumo de uva, lo cual mejoraría la economía de la región y a su vez la competencia a nivel nacional e internacional.



3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Cuantificar mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con detector ultravioleta, el trans-resveratrol presente en los epicarpios de la Uva Isabella (*Vitis labrusca*) cultivada en La Unión-Valle del Cauca.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar el método analítico utilizado en la cuantificación del trans-resveratrol presente en la uva Isabella (*Vitis labrusca*).
- Evaluar las condiciones de extracción y purificación del trans-resveratrol presente en los epicarpios de la uva Isabella (*Vitis labrusca*).
- Cuantificar el contenido de trans-resveratrol que se encuentra en la uva Isabella (*Vitis labrusca*).



4. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

La uva es el mayor cultivo de frutas del mundo.¹ Se reporta una producción anual mayor a 42 millones de toneladas. Los productores más importantes de Vid son Francia, España, Italia y Estados Unidos. En Colombia, la uva se cultiva principalmente en el departamento del Valle del Cauca, región en la cual ha tenido fácil expansión por su adaptación a las condiciones climáticas, elevada productividad y relativa rusticidad.

El Resveratrol está presente en las uvas en las configuraciones cis- y trans- proporcionalmente en relación con las condiciones climáticas teniendo en cuenta que la radiación ultravioleta favorece la formación del isómero cis-, pero nos enfocaremos en isómero trans-². El trans-resveratrol (3,4,5-trihidroxiestilbeno) es un polifenol que pertenece a la familia de los estilbenos. Este compuesto fue reportado por primera vez en hojas de Vid (*Vitis*), Infectadas con el hongo *Botrytis cinerea*. Dicho hongo, al infectar frutos de uva, desencadena la producción de resveratrol, aunque también las heridas en los frutos favorecen la producción de este metabolito. El contenido de trans-resveratrol en la uva, es uno de los parámetros con mayor significación, ya que es uno los fitoquímicos más estudiados debido a su bajo peso molecular con actividad inhibitoria microbiológica que son producidas por la planta como una respuesta de defensa a estímulos exógenos tales como la radiación ultravioleta y particularmente las infecciones microbiológicas. Elegido para ser analizado debido a una variedad de efectos biológicos, incluyendo propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antifúngicas y bactericidas.²

4.1 ORIGEN DE CULTIVO DE UVA EN COLOMBIA

El cultivo comercialmente se inició a comienzos del siglo XX, en los valles de la margen occidental del río Cauca, en el norte del Departamento del Valle del Cauca, con la plantación de extensiones pequeñas que, más tarde, se ampliaron a otras zonas.³ De esta manera, en el año 1932 había viñedos en Antioquia, Santander, Tolima y Santa Marta. Pero solo hasta 1945, se impulsó verdaderamente la viticultura, cuando Alberto Grajales plantó 180 vides en el municipio de La Unión. Las primeras plantas fueron obsequiadas gracias a un proyecto vitícola del gobierno español que dirigió Seferino González en el Municipio de Bolívar, Valle del Cauca. Actualmente, en Colombia se cultivan uvas para consumo en fresco en 16 municipios del Departamento del Valle del Cauca, convirtiéndose así en el mayor productor de vid en Colombia.³



4.2 TAXONOMÍA

El género *Vitis* al que pertenecen las vides cultivadas, está dividido en dos secciones o subgéneros: Euvitis y Muscadinia. En el subgénero Euvitis se distinguen tres grupos: las variedades originarias de América del Norte, que son resistentes a la filoxera “parásito de la vid” y se utilizan fundamentalmente para la producción de patrones (*V. riparia*, *V. rupestris*, *V. berlandieri*, *V. cordifolia*, *V. labrusca*, *V. candicans* y *V. cinérea*), las Asiáticas (10 a 20 especies) y las Europeas, representada por la *V. vinífera*, como única especie que presenta cualidades para la producción de vino, es sensible a la filoxera y a las enfermedades criptogámicas.⁴

La producción de uva de calidad es consecuencia de un manejo adecuado del cultivo, que se logra principalmente con producciones controladas, a través de podas eficientes. Ellas facilitan la eliminación de partes vivas de la planta, para modificar el crecimiento de la cepa adecuándola a las necesidades requeridas. Teniendo en cuenta que al realizar podas cortas implicaría una disminución en la producción, desequilibrio en la planta afectando la calidad del compuesto. En este orden de ideas sería más adecuado dejar sólo la cantidad de yemas de la vid suficientes para proporcionar un número de racimos que la planta pueda soportar en forma óptima.⁵

Según su estructura química (Figura 1), el trans-resveratrol es un compuesto polifenólico, presente en abundante cantidad en las pieles de la uva con aproximadamente 24 mg/g.⁶

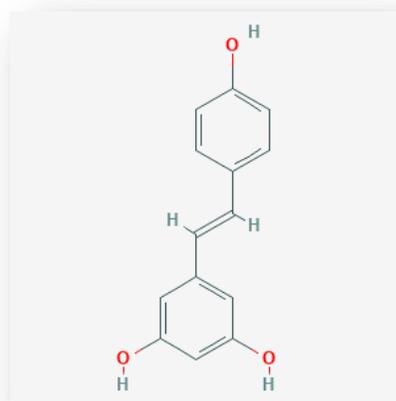


Figura 1. Estructura Química del Trans-resveratrol



La uva violeta tiene una piel muy gruesa (46% de peso de la uva) que acumulan la mayor parte de los compuestos fenólicos de la uva: gran cantidad de antocianinas, flavonoles, derivados de ácido hidroxicinámico y proantocianidinas, pareciendo así ser un productor de resveratrol bajo.⁷



Figura 2. Frutos de la Uva Isabella (*Vitis labrusca*).

Respecto al origen del nombre resveratrol, el profesor Yutaka Ebizuka, de la Universidad de Tokio, propone lo siguiente:⁸

- **Res:** puede estar relacionado con la clase de moléculas a las que pertenece el resveratrol: los resorcinoles
- **veratr:** abreviatura del nombre de la planta *Veratrum grandiflorum*, en la que se encontró resveratrol por primera vez en 1940.
- **ol:** indicativo de la presencia de grupos hidroxilo.

El resveratrol es identificado en 1940 por primera vez en la raíz del eléboro blanco (*Veratrum grandiflorum* O. Loes), y después en las raíces secas de la planta *Poligonum cuspidatum*, llamada Ko-jo-kon en japonés, siendo ésta una de las fuentes más ricas de resveratrol. La planta es ampliamente empleada en la medicina tradicional china y japonesa en el tratamiento de enfermedades tales como dermatitis supurativa, gonorrea, tiña favosa, pie de atleta e hiperlipidemia.⁹

4.2.1 Fruto

Es una baya de forma y tamaño variable. Más o menos esférica u ovalada, y por término medio de 12 a 18 mm de diámetro en uva para mesa y de 7 a 15 mm en uva para vino. Los frutos en variedades de mesa pesan entre 5 y 10 g y los de vino entre 1 y 2 g.¹⁰ Se distinguen tres partes generales en el fruto:¹¹



- **Epicarpio:** conocido como hollejo en la viticultura, es la parte más externa de la uva y como tal, sirve de protección del fruto. Membranoso y con epidermis cutinizada, elástico. En su exterior se forma una capa cerosa llamada pruina. La pruina tiene función protectora y se encarga de fijar las levaduras que fermentan el mosto y también actúa como capa protectora. El epicarpio representa el 7% de la totalidad del fruto.
- **Mesocarpio:** representa la mayor parte del fruto y es conocido como pulpa. La pulpa es translúcida a excepción de las variedades tintoreras (acumulan aquí sus materias colorantes) y muy rica en agua, azúcares, ácidos (málico y tartárico principalmente), aromas, etc., contribuye con el 84% del total del fruto.
- **Semillas o pepitas:** las semillas están rodeadas por una fina capa (endocarpio) que las protege. Son ricas en aceites y taninos. Están presentes en número de 0 a 4 semillas por baya. A la baya sin semillas se la denomina baya apirena. En su interior se encuentra el albumen y embrión, que representan el 4% del fruto.

4.3 INFLUENCIA DEL PH Y LA TEMPERATURA

Algunas propiedades fisicoquímicas del Resveratrol son todavía desconocidas o los resultados de la investigación se contradicen entre sí. Se ha afirmado que este compuesto es altamente fotosensible y rápidamente isomeriza a Cis-resveratrol cuando se expone a luz ultravioleta o visible (Figura 3). Sus aplicaciones son limitadas debido a su baja biodisponibilidad como consecuencia de su solubilidad acuosa, estabilidad limitada y metabolismo hepático extenso. Por el contrario, el efecto del pH sobre la estabilidad ha sido investigado en muy pocos estudios; Trela Waterhouse en 1996 demostró que el trans-resveratrol es estable en tampones con pH 1.0, 3.5 y 7.0 durante 28 días, mientras que a pH 10.0 se degrada rápidamente con una semivida de solo 1,6 h.¹²

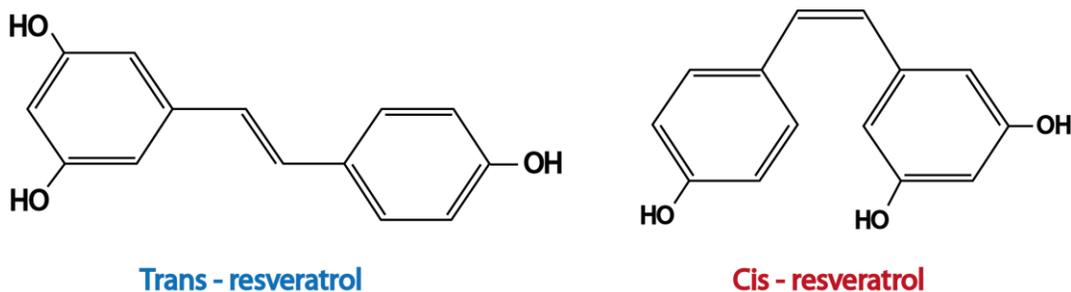


Figura 3. Isomerización del Trans-Resveratrol a la forma Cis.



4.4 COMPUESTOS FENÓLICOS

Los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente. Los fenoles están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal. La característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol.^{13,14}

La uva se considera una fuente importante de compuestos fenólicos en comparación con otras frutas y verduras. Sin embargo, hay muchos cultivos con características distintas directamente relacionadas con el perfil fenólico.¹⁵

En la actualidad este grupo de compuestos de origen vegetal presenta gran interés nutricional por su contribución al mantenimiento de la salud humana. De hecho, desde 1990, varias organizaciones internacionales en el ámbito de la nutrición recomiendan un consumo diario de al menos 5 raciones de frutas y/o verduras para asegurar una adecuada ingesta de antioxidantes y prevenir enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Así, muchos de los efectos beneficiosos asociados al consumo de alimentos de origen vegetal se atribuyen en gran medida a los compuestos fenólicos. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se atribuye a su facilidad para ceder átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre y a la posibilidad de deslocalización de cargas en el sistema de dobles enlaces del anillo aromático.¹⁶ Los compuestos fenólicos poseen además una estructura química ideal para captar iones metálicos (principalmente hierro y cobre) y por tanto para inhibir la formación de radicales libres a través de reacciones tipo Fenton. Vale la pena mencionar que el efecto del resveratrol depende de su estado redox, es decir, si actúa como antioxidante o un prooxidante. La concentración de resveratrol y tipo de célula también son importantes. Los efectos prooxidantes del resveratrol también se demostraron en sistemas microsómicos de hígado de rata, encontrando que el resveratrol inhibía la peroxidación lipídica.¹⁷ Se sabe que el resveratrol actúa como un eliminador de hidroxilo, superóxido y otros radicales. Así evita lesiones de ADN y peroxidación de lípidos en membranas celulares. El resveratrol como antioxidante ejerce un doble efecto, primero aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes y segundo puede actuar como eliminador de radicales libres, manteniendo la concentración de antioxidantes intracelulares en sistemas biológicos.



4.5 SOLUBILIDAD

La estructura química del resveratrol hace que tenga poca solubilidad en agua (< 0,05 mg/mL), lo cual puede afectar a la absorción. Para incrementar dicha solubilidad se puede utilizar etanol (50 mg/mL) o solventes orgánicos. Otra forma de mejorar la solubilidad del resveratrol en agua es utilizando vectores para formar un complejo con el resveratrol, como puede ser el uso de ciclodextrinas. Cabe destacar su capacidad para formar una amplia gama de complejos orgánicos moleculares. La esterificación de grupos hidroxilo con moléculas alifáticas puede también ser empleada como herramienta para incrementar su absorción intestinal y permeabilidad celular como, por ejemplo, la acetilación del resveratrol, lo cual podría aumentar su adsorción e incrementar su captación celular sin pérdida de actividad.¹⁸

4.6 EFECTOS BIOLÓGICOS DEL RESVERATROL

Ya se ha comentado el carácter antifúngico de las fitoalexinas. No obstante, debe tenerse en cuenta que un compuesto natural no tiene por qué estar exento de riesgos toxicológicos para el ser humano, ya que los mayores venenos son productos naturales producidos por plantas o animales. Sin embargo, en el caso concreto de algunas fitoalexinas, como el trans-resveratrol no sólo se ha demostrado la ausencia de dicho carácter tóxico, sino que además presenta grandes beneficios para la salud. El trans-resveratrol se produce en respuesta a factores de estrés, los niveles en las uvas y sus productos son variaciones entre las regiones y cosechas.¹⁹

Las uvas contienen numerosas variedades fenólicas presentes en la piel, pulpa y semillas. Estos compuestos son importantes para la salud humana por sus beneficiosos efectos cardiovasculares, aumento de capacidad antioxidante y resistencia a las lipoproteínas de baja densidad, mejorando la función endotelial y reduciendo el riesgo de daño de los radicales libres, enfermedades crónicas, hipertensión y el cáncer.²⁰ El resveratrol impide la formación de células cancerígenas, detiene la proliferación de las células malignas y actúa como antiinflamatorio.

Actualmente, el resveratrol se comercializa para la investigación médica; además, también está disponible como complemento nutricional (no como un agente terapéutico) en forma de extracto seco purificado cuya fuente principal son las uvas tintas. En cuanto a las precauciones de uso, no se recomienda para las personas que padecen trastornos mentales y hepáticos graves y en mujeres



embarazadas y en periodo de lactancia, además es un producto reservado a los adultos.

4.7 MÉTODO DE ANÁLISIS DE RESVERATROL

Los métodos más utilizados para el análisis de trans-resveratrol y compuestos relacionados en los últimos años, en la mayoría de los trabajos sobre análisis de polifenoles se basan en la utilización de métodos cromatográficos, cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC), cromatografía de gases (CG) o electroforesis capilar (EC) acoplados muchas veces a espectrometría de masas (MS). La CG requiere que los compuestos sean volátiles para lo cual si estos no lo son se utilizan reacciones de derivatización. Las técnicas de HPLC son las más habituales para separar y cuantificar polifenoles debido a la formación de degradación del producto y a su contribución a la absorción a 307 nm.²¹

En general, en las etapas previas de aislamiento y limpieza se utilizan diferentes técnicas separativas tales como extracción sólido-líquido (SPE), extracción líquido-líquido (LLE) y extracción con fluidos supercríticos (SFE), para obtener finalmente una disolución de resveratrol y los restantes compuestos de interés que se analiza mediante cromatografía.



5. METODOLOGÍA PROPUESTA

5.1 PROCEDIMIENTO^{22,23}

5.1.1 Materia Prima

Se colectaron 500 bayas de la variedad Isabella (*Vitis labrusca*). El muestreo fue aleatorio. Se cortaron las bayas de distintas partes del racimo, y con diferente orientación dentro de la Vid, y de plantas diferentes dentro de la misma viña. Las muestras se trasladaron inmediatamente al laboratorio para su proceso.

5.1.2 Secado

- Las 500 bayas recolectadas, (sin practicar lavado) se pelaron manualmente removiendo las semillas y las pulpas se desecharon.
- Los epicarpios correspondientes se colocaron en el equipo de secado durante 2 semanas.
- Finalmente se molieron los epicarpios secos hasta la obtención de un polvo fino y se almacenaron en un frasco ámbar herméticamente sellado.

5.1.3 Extracción

La extracción del trans-resveratrol se realiza mediante la técnica de maceración; se pesan 4.00 g del polvo de piel de uva, se adicionan 100 mL de metanol acidificado con HCl al 1,0% y con agitación constante a temperatura ambiente bajo oscuridad durante 48h. Después se centrifugan a 10000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante se coloca en un rotaevaporador a menos de 35°C hasta eliminar todo el metanol, quedando una mezcla pastosa.

5.1.4 Purificación

La mezcla pastosa obtenida fue sometida a purificación, mediante extracción líquido-líquido: a 20 mL de la mezcla anterior se adicionaron 20 mL de Éter Etílico a temperatura ambiente bajo la oscuridad y con agitación manual durante 10 min, se separa la fase orgánica de la fase acuosa; La fase orgánica se evapora a sequedad a temperatura inferior a 35°C y el residuo se recupera con lavados usando de 2-4 mL de Etanol y se afora a 10 mL.

5.1.5 Análisis Cromatográfico

La separación y cuantificación se realiza por cromatografía líquida de alta eficiencia: se utiliza una columna cromatográfica de fase reversa Waters



Symmetry C₁₈, de 5µm de tamaño de partícula, 4.6mm de diámetro interno y 15 cm de longitud. La fase móvil es 60% de ácido acético 0,1% - 40% metanol grado HPLC en modo isocrático, detector UV/VIS a 307 nm.

5.2 PARÁMETROS DE EVALUACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

5.2.1 Determinación del rango lineal

Se realiza una curva de calibración desde una concentración baja de 2.00 mg/L hasta una concentración alta 200 mg/L, para determinar hasta donde la gráfica presenta un comportamiento lineal. Se determinaron los estimadores de regresión como sus límites de confianza y posterior, pruebas de significancia para determinar la validez de la linealidad.

5.2.2 Curvas de altas, medias y bajas concentraciones

Se realizan curvas de calibración dentro del rango lineal, una de concentraciones bajas, una de concentraciones medias y otra de concentraciones altas; en concentraciones bajas se determina el límite de detección y de cuantificación del instrumento y del método.

5.2.3 Precisión

Precisión del instrumento: Se realizan 10 lecturas consecutivas de un estándar de concentración baja, y se calcularon sus respectivos parámetros estadísticos (Promedio, desviación estándar y %RSD).

Precisión por Día: Se evalúa por medio de la medición de tres estándares de Resveratrol analizados por triplicado en tres días diferentes. Se determina la precisión por repetibilidad (Intradía), la precisión por reproducibilidad (interdías).

Precisión por Muestra: Se determina tomando 3 muestras diferentes, analizando cada muestra una sola vez en tres días distintos.

En cada una de las determinaciones anteriores se calculan sus respectivos parámetros estadísticos (Promedio, desviación estándar y %RSD)

5.2.4 Exactitud

Generalmente se determina como el porcentaje de recuperación de cantidades conocidas adicionadas de analito, método que se conoce como el enriquecimiento



de la muestra con el analito o “dopaje”. Las cantidades de analito adicionadas deben estar por debajo y por encima de los valores normales esperados en muestras reales y deben colocarse dentro del rango lineal de la curva de calibración. Para la determinación de la exactitud se empleó el método de porcentaje de recuperación, el cual se realizó a tres niveles de concentración 80%, 100% y 120%,

5.2.5 Evaluación de la Estabilidad de Estándares

Se realiza para analizar de forma experimental cual es la vida útil de los estándares. Para esto se dejarán estándares de 10 mg/L preparados durante un periodo de tiempo de un mes para ver su degradación, realizando los análisis correspondientes para determinar la estabilidad del analito; este proceso se evalúa mediante la lectura de 6 inyecciones semanales del patrón. A los datos obtenidos se le aplica un análisis de varianza para determinar si los resultados presentan diferencias significativas.

5.3 ANALISIS DE MUESTRAS

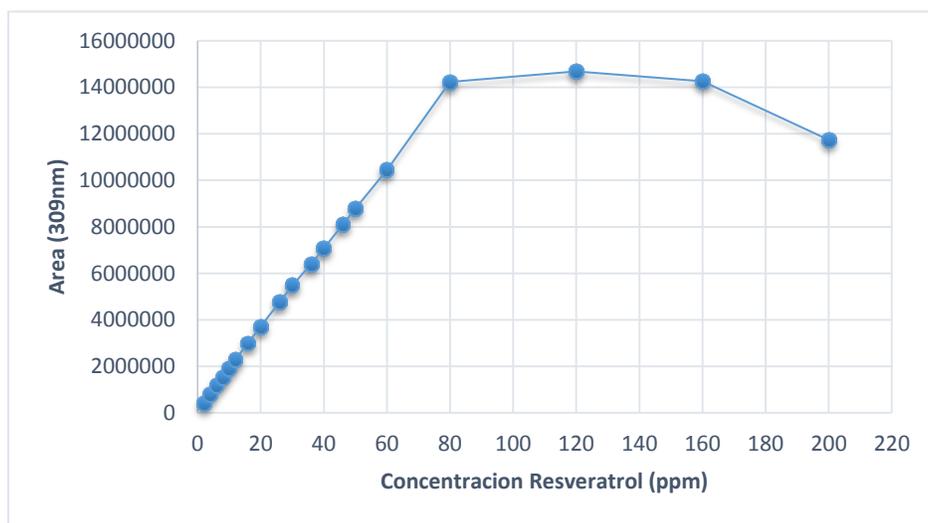
Se toman las muestras según el procedimiento planteado, se realiza el análisis de las muestras, y a los resultados obtenidos se le aplican los modelos estadísticos pertinentes, para conforme a esto realizar las respectivas conclusiones.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

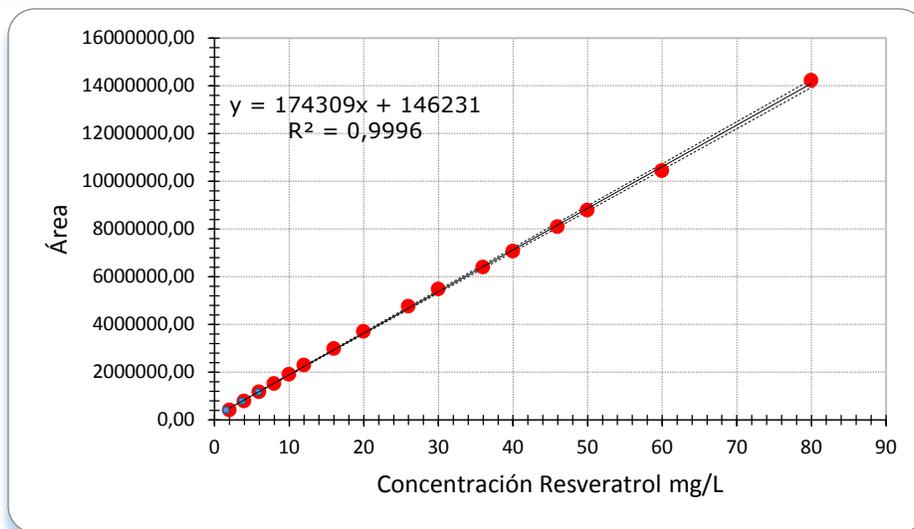
6.1 Determinación del Rango Lineal

Se determinó la linealidad verificando la correlación entre la señal (Área) y la concentración de resveratrol para los rangos de análisis del método, corroborando la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra dentro del rango establecido de 2.00 a 200 mg/L, obteniendo una linealidad entre los estándares de 2 a 80 mg/L. En las gráficas 1 y 2 se muestran los resultados obtenidos.



Gráfica 1. Curva de determinación de rango lineal

En la anterior grafica, se observa el comportamiento de la curva a medida que aumenta la concentración del patron de resveratrol. A partir de 80 mg/L se pierde la linealidad.



Grafica 2. Determinación de Rango Lineal de área vs. Concentración

La anterior grafica muestra una relación lineal entre las dos variables: Área (Variable dependiente) y concentración de Resveratrol en mg/L (Variable independiente).

Tabla 1. Estadísticos para la regresión lineal de la curva de calibración

Parámetro	Valor	Intervalo de confianza al 95%
Pendiente	174309	172248 < b < 176371
Intercepto	146231	73150 < a < 219311
Coefficiente de Correlación r^2	0,9996	N.A.
Coefficiente de Correlación r	0,9998	N.A.
Desviación de la Regresión S_R	84208	N.A.

La Tabla 1 muestra los valores de la pendiente, el intercepto con sus respectivas desviaciones estándar, el coeficiente de determinación, el coeficiente de correlación y la desviación estándar de la regresión. Para determinar los valores obtenidos se utilizaron las siguientes ecuaciones:

Para determinar el Coeficiente de Correlación:

$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{[\sum(x_i - \bar{x})^2][\sum(y_i - \bar{y})^2]}}$$

Con el dato de correlación se empleó una prueba t para ver si es realmente significativo y si difiere de 1. Se plantean las hipótesis:



Hipótesis Nula (H_0): No hay correlación entre los valores de x y de y.

Hipótesis Alterna (H_1): Hay correlación entre los valores de x y de y.

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

Tabla 2. Contraste estadístico para el coeficiente de correlación

Coeficiente de Correlación r	Hipótesis	t estadístico	t crítico 95%	Comparación	Decisión
0,9998	H_0 : No hay correlación entre los valores de x y de y. H_1 : Hay correlación entre los valores de x y de y	181.4	2.14	$t_{est} > t_{crit}$	Se Rechaza H_0

El valor del coeficiente de correlación $r = 0.9998$ muy cercano a 1 está midiendo la fuerza de la relación lineal existente entre la señal analítica y las concentraciones. Según la prueba estadística efectuada anteriormente se rechaza la hipótesis nula (H_0) dejando claro que si existe una correlación lineal significativa entre las dos variables x y y a un nivel de confianza del 95%.

Modelo de regresión curva de calibración: Área = 174309(mg/L Trans-resveratrol) + 146231

6.2 Curvas de Altas, Medias y Bajas concentraciones

Se realizaron tres curvas de calibración, cada patrón leído tres veces. En los anexos 1,2 y 3 (Ver Anexos), se observa los datos obtenidos en cada rango con el promedio total y la desviación, así mismo se muestra cada grafica con su respectiva ecuación de la recta y la desviación estándar del intercepto y la pendiente. A continuación, se presentan las ecuaciones correspondientes:

Para determinar la Desviación estándar de la regresión:

$$S_R = \sqrt{\frac{1}{n-2} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y})^2}$$



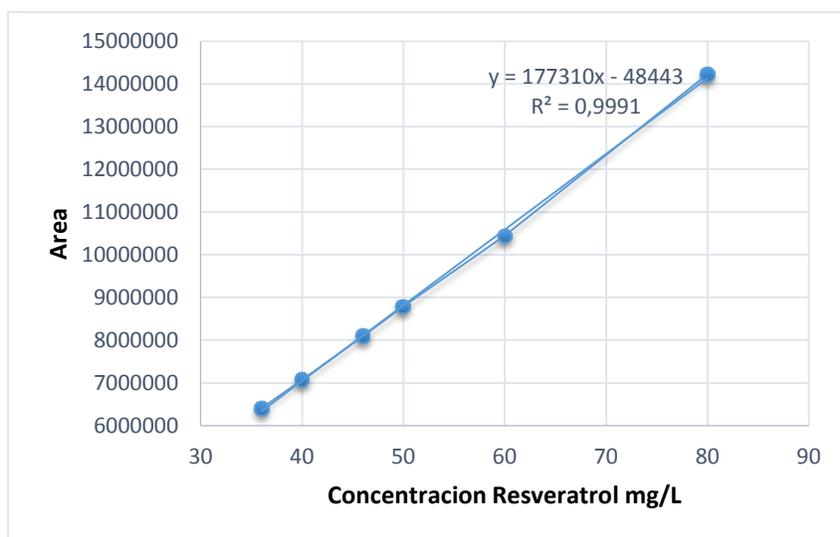
Para determinar la Desviación estándar de la pendiente:

$$S_b = \frac{S_R}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}}$$

Para determinar la Desviación estándar del Intercepto:

$$S_a = S_R \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum(x_i - \bar{x})^2}}$$

6.2.1 Curva Rango Alto



Grafica 3. Curva de Calibración Rango Alto

Si comparamos las gráficas 2 y 3 el intercepto de la gráfica 3 sería negativo debido a que la pendiente es mayor al de la gráfica 2 e igualmente el primer punto de la curva rango alto es 35 mg/L.

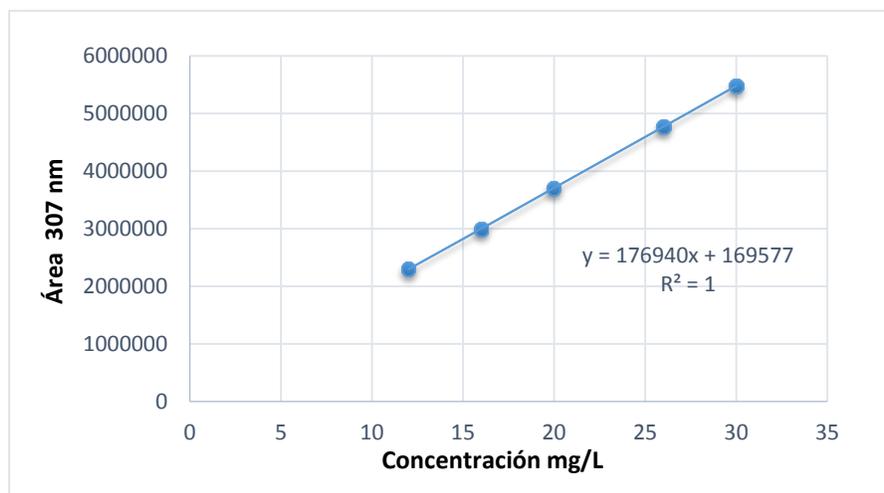
Tabla 3. Resultados obtenidos en la curva de calibración Rango Alto

Parámetro	Valor
Pendiente	177310
Intercepto	-48443
Coefficiente de Correlación r^2	0.9991
Desviación estándar de la regresión S_R	95161
Desviación Estándar de la Pendiente S_b	2652
Desviación Estándar del Intercepto S_a	143250



Modelo de regresión Curva Rango Alto: Área = 177310(mg/L Trans-resveratrol) - 48443

6.2.2 Curva Rango Medio



Grafica 4. Curva de Calibración Rango Medio

Tabla 4. Resultados obtenidos en la curva de calibración Rango Medio

Parámetro	Valor	Intervalo de confianza al 95%
Pendiente	176940	175943 < b < 177937
Intercepto	169577	147844 < a < 191310
Coefficiente de determinación r^2	1	N.A.
Desviación estándar de la regresión S_R	4573	N.A.
Desviación Estándar de la Pendiente S_b	314	N.A.
Desviación Estándar del Intercepto S_a	6834	N.A.

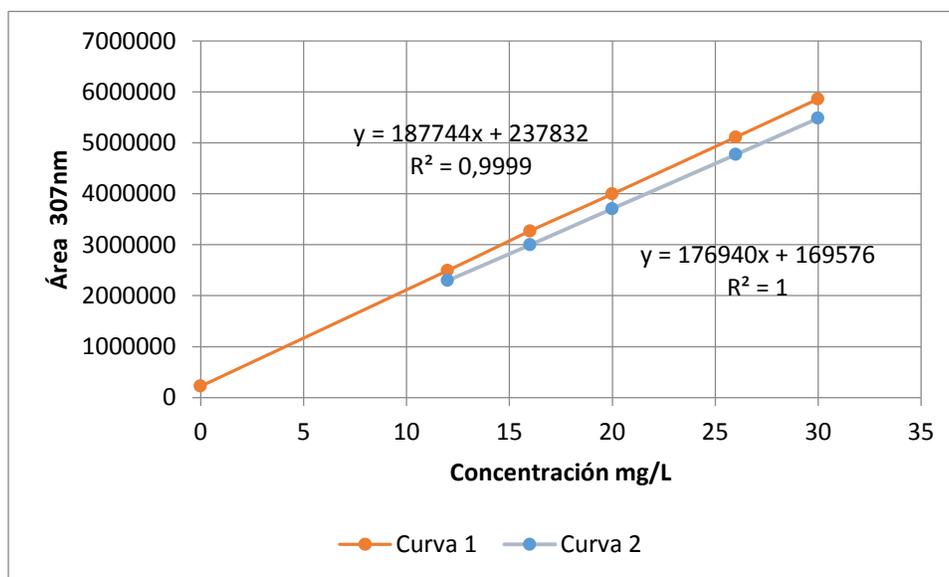
Modelo de regresión Curva Rango Medio: Área = 176940(mg/L Trans-resveratrol) + 169577

6.2.2.1 Evaluación de la presencia de interferencias de matriz

Se realizó una curva de adición estándar con patrones de resveratrol de concentraciones 0.0, 12.0, 16.0, 20.0, 26.0 y 30.0 mg/L llevando a volumen con muestra extraída de los epicarpios de la uva isabella (*Vitis labrusca*). Se inyectó cada patrón al equipo de HPLC y los datos obtenidos fueron comparados con la



curva de calibración de rango medio para determinar si hay interferencia o efecto de matriz.



Grafica 5. Curvas Rango Medio y de Adición de Estándar para la Evaluación de interferencias de matriz

La grafica 5 muestra los valores de las pendientes para las curvas de calibración rango medio (curva 2) y de adición de estándar (curva 1), teniendo esto, se prueba con un contraste estadístico t que las pendientes estadísticamente no son significativamente diferentes, pero antes se realiza una prueba F para la comparación de las desviaciones estándar obtenidas.

$$F = S_1^2 / S_2^2$$

Donde S_1 (Desviación estándar de la curva de adición estándar) y S_2 (Desviación estándar de la curva de calibración rango medio). Si S_1 es mayor a S_2 se toma S_1 como numerador y se dispone en la ecuación de modo que F sea siempre ≥ 1 . Las diferencias respecto a 1 se deben a variaciones aleatorias, si la hipótesis nula es verdadera entonces la relación de varianzas debería ser próxima o mayor a 1, pero si la diferencia es demasiado grande, es decir supera cierto valor crítico obtenido en la tabla F, entonces se rechaza la hipótesis nula.²⁴



Tabla 5. Contraste de comparación entre las desviaciones estándar de las Curvas de calibración Rango Medio y de adición de estándar

Desviación S_1 S_2	Hipótesis	F Estadístico	F crítico 95%	Comparación	Decisión
2010464	$H_0 : S_1 = S_2$	2.43	14.88	$F_{est} < F_{crit}$	Se acepta H_0
1290575	$H_1 : S_1 \neq S_2$				

Los resultados del análisis de la prueba F de la tabla 5 muestran que se acepta la hipótesis nula (H_0), es decir, no hay diferencia significativa entre las dos desviaciones estándar, por tanto, indican que es necesario aplicar un contraste t para desviaciones estándar iguales, para decidir si la diferencia entre las pendientes de ambas curvas es significativa o si las diferencias se justifican sólo por variaciones aleatorias.

$$t = \frac{(b_1 - b_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Donde S se calcula a partir de

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

Donde b_1 es la pendiente de la curva de adición estándar y la b_2 es la pendiente de la curva de calibración rango medio.

Así mismo se plantean las siguientes Hipótesis:

Hipótesis nula (H_0): La pendiente de la curva de calibración por estándar externo no es diferente de la pendiente de la curva de calibración por adición estándar.

Hipótesis Alternativa (H_1): La pendiente de la curva de calibración por estándar externo es diferente de la pendiente de la curva de calibración por adición estándar.

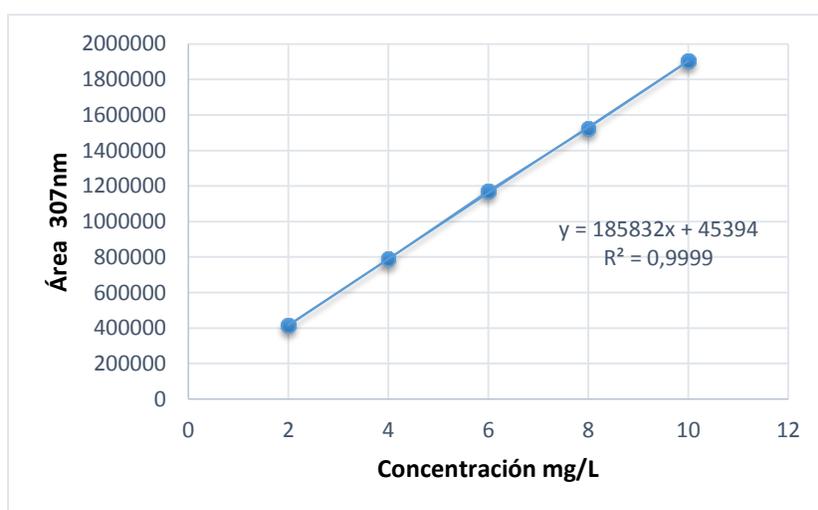


Tabla 6. Contraste de significación entre las pendientes de las Curvas de calibración Rango Medio y de adición de estándar

Pendiente b_1 b_2	Hipótesis	t estadístico	t crítico	Comparación	Decisión
187744 176940	$H_0 : b_1 = b_2$ $H_1 : b_1 \neq b_2$	2.19E-9	2.26	$t_{est} < t_{crit}$	Se acepta H_0

Los resultados de la tabla 6 muestran que no existen diferencias significativas entre ambas curvas, por tal razón puede concluirse que es muy probable que las diferencias entre las pendientes se deban a variaciones aleatorias. Como las pendientes estadísticamente no son significativamente diferentes, por lo tanto, las rectas son paralelas como lo muestra la gráfica 5, indicando que no existen interferencias de matriz en el método para la determinación de trans-resveratrol en la uva Isabella (*Vitis labrusca*). Las señales analíticas medidas por ambas curvas difieren en un valor constante y que cualquiera de ellas es útil para medir la concentración, no obstante, generalmente el método de adición de estándar es dispendioso y no proporciona la misma precisión que el método convencional, ya que las concentraciones se determinan por extrapolación y, por tal razón es más conveniente y práctico utilizar una curva de calibración regular.

6.2.3 Curva Rango Bajo



Grafica 6. Curva de Calibración Rango Bajo



Tabla 7. Resultados obtenidos en la curva de calibración Rango Bajo

Parámetro	Valor	Intervalo de confianza al 95%
Pendiente	185832	182161 < b < 189503
Intercepto	45394	21042 < a < 69746
Coefficiente de determinación r^2	0,9999	N.A.
Desviación estándar de la regresión S_R	7301	N.A.
Desviación Estándar de la Pendiente S_b	1154	N.A.
Desviación Estándar del Intercepto S_a	7658	N.A.

Modelo de regresión Curva Rango Bajo: Área = 185832(mg/L Trans-resveratrol) + 45394

6.2.3.1 Límite de Detección y Cuantificación del Instrumento

El límite de detección y cuantificación del instrumento se calcula a partir de la curva de calibración del rango bajo, reportada en el anexo 3 (Ver Anexos) y teniendo en cuenta los valores obtenidos en la tabla 8 a través del proceso experimental.

Tabla 8. Estadísticos de regresión para el cálculo de Límite de Detección y Cuantificación

Estadístico	Valor
Pendiente (b)	185832
Intercepto (a)	45394
Coefficiente de correlación r	0.9999
Desviación estándar de la regresión S_R	7301

Límite de Detección, C_D

Es la concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la señal del blanco o ruido de fondo.²⁴

$$y_D = kS_R + y_B \quad y_D = bC_D + a$$

Igualando ambas ecuaciones se tiene

$$kS_R + y_B = bC_D + a \quad y_B \cong a$$

$$kS_R = bC_D \quad \text{despejando } C_D$$

$$C_D = k \frac{S_R}{b}$$



Donde:

y_D = Señal Limite de Deteccion

S_R = Desviacion Estandar de la Regresion

C_D = Concentracion en el Limite de Deteccion

C_C = Concentracion en el Limite de Cuantificacion

Se reemplaza en la ecuación:

$$C_D = k \frac{S_R}{b} \quad k = 3$$

$$C_D = 3 \cdot \frac{7301}{185832} = 0.118 \frac{mg}{L}$$

Límite de Cuantificación, C_C

Es considerado como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas, como opuesto a la detección cualitativa.²⁴

$$C_C = k \frac{S_R}{b} \quad k = 10$$

$$C_C = 10 \cdot \frac{7301}{185832} = 0.393 \frac{mg}{L}$$

La concentración del límite de detección del instrumento obtenido es de 0.118 mg/L, reportando así mismo una concentración del límite de cuantificación de 0.393 mg/L.

6.2.3.2 Límite de Detección y Cuantificación del Método

Según el procedimiento realizado para la cuantificación de trans-resveratrol, se utilizaron 4.0000 g de piel de uva, llevándolo a 100 mL metanol acidificado y obteniendo 10 mL de extracto. Teniendo en cuenta los valores anteriores $C_D = 0.118$ mg/L y $C_C = 0.393$ mg/L, el límite de detección y cuantificación del método se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$V_1 * C_1 = V_2 * C_2 \quad \text{Despejando } C_1$$

$$C_1 = \frac{V_2 * C_2}{V_1}$$



Para el Limite de Detección del Método

$$C_1 = \frac{10mL * 0.118mg/L}{100mL} = 0.0118 \frac{mg}{L} = 1.18 \mu g$$

Según lo obtenido el límite de detección del método es 1.18 μg trans-resveratrol en 4.0000 g de Muestra o 29.5 μg de trans-resveratrol en 100 g de muestra.

Para el Limite de Cuantificación del Método

$$C_1 = \frac{10mL * 0.393mg/L}{100mL} = 0.0393 \frac{mg}{L} = 3.93 \mu g$$

Según lo obtenido el límite de cuantificación del método es 3.93 μg trans-resveratrol en 4.0000 g de muestra o 98.2 μg de trans-resveratrol en 100 g de muestra.

6.3 Precisión

6.3.1 Precisión del Instrumento

En la tabla 9 se enseñan los resultados correspondientes a este estudio. Para este caso específico se utilizó una concentración nominal baja de 8.00 mg/L, realizando 10 lecturas consecutivas.

Tabla 9. Resultados de Análisis de Precisión del Instrumento

PATRON	AREA
8.00 ppm	1500251
8.00 ppm	1498332
8.00 ppm	1496461
8.00 ppm	1493466
8.00 ppm	1493175
8.00 ppm	1488973
8.00 ppm	1489228
8.00 ppm	1489818
8.00 ppm	1490143
8.00 ppm	1484287
PROMEDIO	1492413
DESV. ESTÁNDAR	4881
% RSD	0,33



De acuerdo a los resultados obtenidos de concentración, se obtiene un valor promedio ($n = 10$) de 1492413 y una desviación estándar de 4881 con un coeficiente de variación del 0.33%, lo cual no es significativa, además de cumplir con una desviación estándar relativa (RSD) menor de 2%.

6.3.2 Precisión por Día

Se determinó experimentalmente midiendo tres estándares de Resveratrol, analizados por triplicado en tres días diferentes; a los resultados obtenidos se les aplicó las herramientas estadísticas (Promedio, Desviación Estándar y Desviación estándar relativa (RSD)). Se determinó la precisión como repetibilidad (Intradía), la precisión como reproducibilidad (interdías).

Tabla 10. Repetibilidad y Reproducibilidad para estándares 5, 10 y 20 mg/L

PATRON	DIA 1	DIA 2	DIA 3	
5 ppm	4.91	4.95	4.9	PROMEDIO TOTAL
5 ppm	4.91	4.96	4.95	4.93
5 ppm	4.91	4.95	4.95	DES. EST. COMBINADA
Promedio	4.91	4.95	4.93	0.0002
Desv. Estand.	0.0000	0.0047	0.0236	% RSD TOTAL
% RSD	0.0000	0.0952	0.4778	0.0033

PATRON	DIA 1	DIA 2	DIA 3	
10 ppm	10.00	10.01	9.99	PROMEDIO TOTAL
10 ppm	10.01	10.03	10.02	10,01
10 ppm	10.00	10.02	10.02	DES. EST. COMBINADA
Promedio	10.00	10.02	10.01	0.0001
Desv. Estand.	0.0047	0.0082	0.0141	% RSD TOTAL
% RSD	0.0471	0.0815	0.1413	0.0008

PATRON	DIA 1	DIA 2	DIA 3	
20 ppm	20.03	19.99	20.03	PROMEDIO TOTAL
20 ppm	20.02	19.98	20.01	20,01
20 ppm	20.05	20.01	19.98	DES. EST. COMBINADA



Promedio	20.03	19.99	20.01	0.0002
Desv. Estand.	0.0125	0.0125	0.0205	% RSD TOTAL
% RSD	0.0623	0.0624	0.1027	0.0010

El porcentaje de desviación estándar relativa (RSD) se obtuvo por medio de la siguiente ecuación:

$$\% RSD = \frac{\text{Desviación Estandar}}{\text{Promedio}} \times 100$$

Se calculó una desviación estándar combinada ya que esta logra abarcar todos los datos obtenidos para un mejor cálculo de precisión por reproducibilidad, utilizando la siguiente ecuación:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2 + (n_3 - 1)s_3^2}{(n_1 + n_2 + n_3 - 3)}$$

Para un mismo día en la tabla 10 se observa la repetibilidad de los resultados para 3 diferentes niveles de concentración obteniendo un RSD entre 0.0000 y 0.4778; La reproducibilidad de las soluciones estándar estudiadas se aprecia teniendo en cuenta la desviación estándar combinada hallada (0.0002, 0.0001 y 0.0002), mediante la cual se determinó la desviación estándar relativa obteniendo valores entre 0.0008 y 0.0033, ambos resultados < 2%.

6.3.3 Precisión por muestra

La precisión por muestra se determinó por medio de la medición de tres muestras en tres días diferentes. Los resultados obtenidos se les aplicó las herramientas estadísticas (Promedio, Desviación Estándar y % RSD). Se determinó la precisión como repetibilidad (Intradía), la precisión como reproducibilidad (interdías).

Tabla 11. Resultados de precisión por Muestra

MUESTRA	CONCENTRACION (ppm)			PROMEDIO TOTAL
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	
1	14.4	16.5	15.4	15.4
2	15.7	14.6	16.1	



3	16.3	15.5	14.1	DESV. ESTA. COMBINADA
Promedio	15.5	15.5	15.2	0.55
Desv. Estand.	0.79	0.78	0.83	% RSD
% RSD	5.1	5.0	5.5	3.6

Como se observa en la tabla 11, las concentraciones obtenidas en cada muestra no difieren la una de la otra dentro del mismo día, presentando un %RSD entre 5.0 y 5.5. La reproducibilidad de las muestras analizadas se aprecia teniendo en cuenta una desviación estándar combinada permitiendo utilizar todos los datos obtenidos (interdías e intradías), obteniendo un RSD del 3.6% menor al 6%.

6.4 Exactitud

Para la determinación de la exactitud se empleó el método de porcentaje de recuperación, el cual se realizó a tres niveles de concentración 80%, 100% y 120%, leyendo 5 veces (Ver Tabla 12). Se tuvo en cuenta las siguientes ecuaciones:

Para calcular la concentración del patrón (C_p):

$$C_p = \frac{C_R(V_m + V_p) - (C_m V_m)}{V_p}$$

Para hallar la concentración Adicionada (C_A):

$$C_A = \frac{V_p(C_p - C_m)}{V_m + V_p}$$

Donde:

C_R = Concentración Resultante

V_m = Volumen de Muestra

C_m = Concentración de Muestra

V_p = Volumen de Patrón

C_p = Concentración de Patrón

Para Calcular el % de Recuperación:

$$\%R = \frac{C_R - C_m}{C_A} \times 100 \quad \text{Donde } C_R = C_m + C_A$$



Tabla 12. Porcentajes de recuperación para el análisis de Exactitud

% ADICION	Concentración Muestra (ppm)	Concentración Adicionada (ppm)	Concentración Resultante (ppm)	% Recuperación
80	8,0	6,4	14,6	103
	8,0	6,4	14,5	102
	8,0	6,4	14,6	103
	8,0	6,4	14,5	102
	8,0	6,4	14,3	98
	PROMEDIO			
100	8,0	8,0	16,4	105
	8,0	8,0	16,2	103
	8,0	8,0	15,9	99
	8,0	8,0	15,9	99
	8,0	8,0	16,5	106
	PROMEDIO			
120	8,0	9,6	17,8	102
	8,0	9,6	18,4	108
	8,0	9,6	17,6	100
	8,0	9,6	17,2	96
	8,0	9,6	17,4	98
	PROMEDIO			

Las muestras analizadas fueron dopadas adicionando 0.5 mL del patrón de resveratrol, este procedimiento se realizó a temperatura entre 21°C y 23°C. Las muestras se inyectaron en el menor tiempo posible para evitar su degradación. La tabla 12, muestra que el porcentaje de recuperación de las muestras están entre el 96% y el 108%.

6.5 Estabilidad de Estándares

Tabla 13. Resultados análisis de estabilidad de patrón por Semana

No.	PATRON	CONCENTRACION (ppm)			
		SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4
1	10.0 ppm	10,2	10,5	10,5	10,4
2	10.0 ppm	10,4	10,4	10,4	10,3
3	10.0 ppm	10,1	10,6	10,6	10,2
4	10.0 ppm	10,5	10,5	10,4	10,3
5	10.0 ppm	10,6	10,6	10,2	10,4
6	10.0 ppm	10,5	10,5	10,4	10,3



PROMEDIO	10,4	10,5	10,4	10,3
DESV. ESTAND.	0,19	0,10	0,13	0,08
% CV	1,78	0,91	1,28	0,79

La estabilidad del analito se evaluó por triplicado en dos días por semana durante 1 mes con un estándar de 10.0 mg/L, corroborando así la estabilidad en condiciones de almacenamiento a 4°C (semana 1, 2, 3 y 4). Permitiendo valorar la estabilidad del analito con base en el tiempo estimado de permanencia a temperatura de refrigeración y tener en cuenta la estabilidad del patrón después de diferentes ciclos de enfriamiento – Temperatura ambiente (21°C). Finalmente se comprobó la estabilidad del analito en la matriz luego de someterse a las condiciones empleadas, teniendo en cuenta que su coeficiente de variación es menor al 2% (Ver Tabla 13).

A los resultados obtenidos se le aplicó un análisis de varianza (ANOVA) se determinó la precisión por repetibilidad, la precisión entre semanas, la precisión por reproducibilidad y la componente sistemática de la precisión. Para evaluar la validez de la precisión se plantean las siguientes hipótesis:

Hipótesis Nula (H₀): Los resultados promedios de cada semana no difieren significativamente entre sí.

$$H_0 : \bar{x}_1 = \bar{x}_2 = \bar{x}_3 = \bar{x}_4$$

Hipótesis Alterna (H₁): Por lo menos dos de los resultados promedios difieren significativamente entre sí.

$$H_1 : \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2 \neq \bar{x}_3 \neq \bar{x}_4$$

Tabla 14. Resultados de Análisis de Varianza del estándar 10.0 mg/L leído durante 4 semanas

Estándar mg/L	Promedio mg/L	Repetibilidad		Precisión entre Semanas		Reproducibilidad ensayo		Componente Sistemática de la precisión S _{sis}	Prueba F F _{est} < F _{crít} Acepta H ₀	
		Sr	%CVr	Sb	%CVb	SR	%CVR		F _{est.}	F _{crít}
10	10,41	0,1291	1,24	0,2041	1,96	0,1443	1,39	0,0645	2,50	3,10

La aceptación o rechazo de las hipótesis se realiza con el contraste estadístico de Fisher que compara la varianza entre semanas con la varianza dentro de las semanas. Según los resultados obtenidos en la Tabla 14 se acepta la Hipótesis nula (H₀) permitiendo demostrar que la dispersión de los resultados es debida solamente al azar.



6.6 ANÁLISIS DE MUESTRAS

El muestreo fue realizado en la casa Grajales ubicado en la Unión - Valle del Cauca. Las muestras fueron tomadas al azar en distintos puntos, recolectando 500 bayas de diversas partes del racimo, con diferente orientación dentro de la Vid y de diversas plantas dentro de la misma viña. En la figura 4 se muestra el mapa satelital (Casa Grajales).



Figura 4. Mapa Satelital de la ubicación de la Casa Grajales

Los resultados obtenidos en la cuantificación de trans-resveratrol en la uva isabella (*Vitis labrusca*) se muestran a continuación:

Tabla 15. Concentración de Trans-resveatrol en la Uva Isabella (*Vitis labrusca*) obtenidas en el Muestreo realizado en la Unión – Valle del Cauca

PUNTO DE MUESTREO	PESO (g)	TEMPERATURA (°C)	AREA	CONCENTRACION (ppm)
1	4,0001	21,3	1425030	7,42
1	4,0001	21,0	1381783	7,19
1	4,0001	20,7	1545852	8,07
1	4,0002	20,9	1914451	10,1
1	4,0001	20,7	1971237	10,4
1	4,0001	20,7	2181783	11,4



1	4,0002	21,4	1935000	10,2
1	4,0001	21,3	1961400	10,3
1	4,0002	20,8	2129471	11,1
1	4,0001	21,3	2438062	12,8
PROMEDIO				9,9

2	4,0001	20,8	2535000	13,4
2	4,0002	21,3	2947097	15,7
2	3,9999	20,9	3046554	16,3
2	4,0001	21,1	3097318	16,5
2	4,0002	20,8	3142617	16,8
2	4,0002	20,9	3170771	17,0
2	3,9999	21,5	3184164	17,0
2	4,0001	21,3	3343492	17,9
2	4,0000	21,0	3287701	17,6
2	4,0002	21,2	3315487	17,8
PROMEDIO				16,6

3	4,0003	21,1	3493658	18,8
3	4,0001	21,5	3447952	18,5
3	4,0001	20,8	3550602	19,1
3	4,0002	20,8	3579499	19,3
3	4,0001	21,4	3792210	20,5
3	4,0001	20,8	3860493	20,9
3	4,0001	21,3	3921569	21,2
3	4,0002	20,8	3863880	20,9
3	4,0001	20,9	3933053	21,3
3	3,9999	21,1	3833053	20,7
PROMEDIO				20,1

De acuerdo a los resultados de la tabla 15, en el primer punto de muestreo se obtuvieron concentraciones entre 7,19 y 12,8 mg/L; en el segundo punto concentraciones entre 13,4 y 17,9 mg/L y en el tercer punto concentraciones entre 18,5 y 21,3 mg/L. Las muestras fueron tomadas en plantas diferentes al azar para determinar si hay diferencia en cuanto a la concentración de trans-resveratrol. Al realizar el análisis de cada punto de muestreo se observan algunas diferencias, debido al cuidado, poda y cultivo de la viña, ya que el tipo de poda afecta significativamente el pH de las bayas creciendo paralelamente con el contenido de azúcar en la misma, disminuyendo así su concentración.²⁵

El tiempo de corrida en el equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para el análisis fue 8 a 10 minutos a una longitud de onda de 307 nm que corresponde al máximo de absorbancia del trans-Resveratrol. La aplicabilidad del método desarrollado fue poco probada en estudios previos. Sin embargo, a nivel mundial se ha logrado obtener concentraciones de trans-resveratrol en promedio de 7,7 mg/L, igualmente contenidos de entre 1,7 y 4,2 mg/L, y en países como



Argentina y Chile se han encontrado concentraciones un poco más bajas de hasta 1,2 mg/L.^{26,27}

Si bien el método descrito permite determinar trans- y cis-resveratrol, pero hemos centrado nuestros esfuerzos en determinar sólo el trans-resveratrol dado que este es el isómero realmente de interés. En las condiciones experimentales establecidas el isómero cis- no interfiere ya que su tiempo de retención es diferente al isómero trans.

Varios estudios en la determinación de polifenoles han demostrado que el nivel de compuestos fenólicos en las frutas depende en gran medida de muchos factores externos e internos, como la variedad, la etapa de madurez, el almacenamiento y los factores ambientales o genéticos.²⁸ Entre estos, se ha demostrado que la luz, la temperatura, el oxígeno, el etileno, los reguladores del crecimiento, los nutrientes y los pesticidas afectan el metabolismo fenólico. También se ha encontrado que el nivel de compuestos fenólicos en una planta aumenta como respuesta a la infección por fitopatógenos de acuerdo con el papel propuesto de estos compuestos en el mecanismo de defensa de la planta.²⁹

De acuerdo con lo anterior es probable que las diferencias en el contenido obtenido de trans-Resveratrol están influenciados por varios factores como el pH y la temperatura en la producción de uva. Teniendo en cuenta esta información se puede apreciar el porqué de la variación de la cuantificación del trans-resveratrol entre los muestreos realizados. Algunos estudios han afirmado que el trans-resveratrol tiene una estabilidad limitada bajo la influencia de luz lo que puede causar isomerización o degradación del compuesto.³⁰ Todas las muestras fueron tratadas según la metodología para la extracción y análisis de compuestos polifenólicos en alimentos, basándose en una extracción con metanol acidificado, posterior una purificación con éter etílico y por ultimo una separación cromatografía por HPLC.



7. CONCLUSIONES

El método empleado al ser evaluado satisfactoriamente demostró ser eficiente para la cuantificación de trans-Resveratrol. Se logró implementar una metodología analítica para la extracción sólido-Líquido con metanol acidificado, demostrando que el Trans-Resveratrol era relativamente estable en condiciones ácidas. Los resultados indican que el método en las condiciones trabajadas es confiable. Sin embargo, es importante señalar que la vida media de Trans-Resveratrol depende de las condiciones de pH, temperatura y exposición a la Luz.

La curva de cuantificación es lineal entre concentraciones de 2.0. – 80.0 mg/L, de acuerdo con la validación realizada, además de ser preciso, ya que el grado de concordancia que existe entre las pruebas realizadas al 100% de concentración nos permite obtener resultados repetitivos, obteniéndose una desviación estándar relativa (RSD) menor al 2% en cada replica. Adicionalmente, no hubo diferencias estadísticas significativas entre los ensayos realizados en días diferentes.

Los resultados obtenidos con el método descrito HPLC al ser validado satisfactoriamente demostró ser eficiente para la determinación de trans-resveratrol, y ya que la absorción de los compuestos polifenólicos se ve afectada por la naturaleza de los disolventes, el pH de los extractos y otros compuestos que pueden actuar como interferencias (grasas, vitaminas, aminoácidos), las técnicas de HPLC son las más habituales para separar y cuantificar polifenoles. Teniendo en cuenta lo anterior las muestras fueron analizadas en medio ácido a temperatura constante permitiendo obtener concentraciones desde 7.2 mg/L hasta 21.3 mg/L

La linealidad, precisión y exactitud de la señal cromatografía obtenida, hacen de esta metodología una excelente herramienta para la cuantificación de trans-resveratrol en los epicarpios de la uva isabella (*Vitis labrusca*). El uso de una fase móvil, que no requiere la preparación de soluciones tampón, simplifica de forma significativa el desarrollo del ensayo y reduce los tiempos de retención en algunos análisis. Además de tener en cuenta que la estabilidad y recuperación de trans-Resveratrol en las muestras no se vieran afectadas ni por el tiempo de almacenamiento, ni por las condiciones de trabajo, demostrando así la estabilidad del analito.

Después de las pruebas realizadas, el procedimiento para determinar trans-resveratrol, fue evaluado para asegurar una adecuada cuantificación del compuesto. El procedimiento se realizó mediante el desarrollo primeramente de una confirmación del método, teniendo en cuenta los parámetros estadísticos de linealidad, rango, precisión, exactitud y estabilidad para lograr establecer mediante



los resultados obtenidos que las características de desempeño del método son aptas para las aplicaciones analíticas previstas.

El pico de trans-resveratrol en el cronograma de la uva se identificó por comparación de su espectro y tiempo de retención con el estándar preparado y leído previamente. En la figura 5 (Ver Anexos), se muestra el cronograma de la solución estándar. Como puede verse el cronograma muestra un tiempo de retención entre 6.00 y 7.00 indicando la aparición del compuesto a analizar. Mediante la calibración realizada y el área de los picos de la solución estándar frente a la concentración de estos, se observa que el tiempo de retención y las áreas son similares después de varias inyecciones. Comparando además el perfil de la muestra con la misma pero dopada con un estándar, se comprueba que no se producen interferencia en el pico (ver Figuras 6 y 7, Anexos).

Sin embargo, la variación del contenido de trans-Resveratrol obtenido, presenta una pequeña diferencia en concentración entre los puntos muestreados debido a la etapa de madurez, el almacenamiento y los factores ambientales al momento del muestreo. Estas afirmaciones se basan en los resultados, que mostraron una alta concentración del compuesto in vitro en la Uva Isabella. Quizás, los efectos biológicos de los productos de uva presentes como el trans-resveratrol, son una respuesta aguda en marcadores bioquímicos y fisiológicos.



8. BIBLIOGRAFÍA

1. HERNANDEZ, C. JOSE; CANTILLO, P. WILLIAM; Potencial fenolico de la uva isabella (*Vitis labrusca*) cultivada en Villa del Rosario, Universidad de Cartagena. Facultad de ciencias exactas. 2010, Pag 2.
2. RODRIGUEZ, M.A; GONZALEZ, G; GARCIA, F.J Y PEREZ, J.P. Contenido en Trans-resveratrol de los vinos tintos de Tenerife. Universidad de la Laguna. 2010 Pag 89.
3. MERCHÁN, A. Determinación del Crecimiento y Desarrollo del Fruto de Vid bajo condiciones de clima frío tropical En: Manual de frutales. Tomo 2. Editor: G. Fischer. Ed. Produmedios. Bogota, 2011. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia, Facultad Agronomía.
4. TESSIER, C; DAVID, J, THIS, P; BOURSQOT, J y CHARRIER, A. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.* 98. 2009. Pag 171 - 177
5. WALTEROS, Y. INGRID; MOLANO, DEISY C. y ALMANZA-MERCHAN, PEDRO J. Efectos de la Poda sobre la Produccion y Calidad de Frutos de *Vitis Vinifera* L. Var. Sauvignon blanc en Sutamarchan - Boyaca. Vol.17 Universidad pedagogica y Tecnologica de Colombia Tunja. 2013
6. KURSVIETIENE, LOLITA; STANEVICIENE, INGA y MONGIRDIENE, AUSRA. Multiplicity of Effects and Health Benefits of Resveratrol. The Lithuanian University of Health Sciences. 2016
7. GOMES REBELLO, L.P; LAGO – VANZELA, S.E. y TEIXEIRA BARCIA, M. Phenolic composition of the Berry parts of Hybrid Grape cultivar BRS Violeta using HPLC. *Food Research International* 54. 2013
8. Disponible en: www.biologie.uni-freiburg.de/data/bio2/schoroeder/Resveratrol 2018
9. CICHEWICZ R.H., KOUZI S.A. Oligomers of Resveratrol and Ferulic Acid Prepared by Peroxidase-Catalyzed Oxidation and Their Protective Effects on Cardiac Injury. *En: J. Nat. Prod. Chem.* 2011.
10. MERCHAN, A. Evolución de parámetros fisicoquímicos durante la maduración de frutos de *Vitis vinifera* L. Tunja. Trabajo para ascenso en el escalafón. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. 2010. pag. 38
11. HIDALGO, L. Tratado de viticultura general. Madrid: 1 Ed. Mundi-Prensa.
12. ZUPANCIC, SPELA; LAVRIC, ZORAN y KRISTL, JULIJANA. Stability and Solubility of Trans-resveratrol are Strongly Influenced by pH and Temperature. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 93. 2015. Pag 197,198.
13. ROBBINS, R. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *En: Journal Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 51; p. ISSN 51. 2011
14. KÄHKÖNEN, MARJA; ANU I. Copia and Marina Heinonen. Berry phenolics and their Antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 49. 2010



15. GOMES REBELLO, L.P; LAGO – VANZELA, S.E. y TEIXEIRA BARCIA, M. Phenolic composition of the Berry parts of Hybrid Grape cultivar BRS Violet using HPLC. Food Research International 54. 2013
16. MACHADO M. MICHAEL; BOLIGON, ALINE; BARRIO, J. PABLO. Determination of polyphenol contents and antioxidant capacity of no – alcoholic red grape products (*Vitis labrusca*) from conventional and organic crops. Universidad Federal de Santa María, Av. Roraima – Brasil. Volumen 34 No. 5, 2011. Pág. 798 – 803.
17. KURSVIETIENE, LOLITA; STANEVICIENE, INGA y MONGIRDIENE, AUSRA. Multiplicity of Effects and Health Benefits of Resveratrol. The Lithuanian University of Health Sciences. 2016
18. GAMBINI, JUAN.; LOPEZ, RAUL; GONZALEZ, GLORIA., Resveratrol: Distribución, propiedades y perspectivas., Universidad de Valencia INCLIVA., Valencia, España. ELSEVIER DOYMA. 2015.
19. MACHADO M. MICHAEL; BOLIGON, ALINE; BARRIO, J. PABLO. Determination of polyphenol contents and antioxidant capacity of no – alcoholic red grape products (*Vitis labrusca*) from conventional and organic crops. Universidad Federal de Santa María, Av. Roraima – Brasil. Volumen 34 No. 5, 2011. Pág. 798 – 803.
20. BERTOLETTI, B. LUCIANE; BIASI, LUIZ A. y PROFIO, DI FREDERICK. Use of HPLC for characterization of sugar and Phenolic Compounds in Vitis Labrusca Juice. Vol. 32 IDESIA (Chile), 2014. Pag. 89 - 94
21. ZUPANCIC, SPELA; LAVRIC, ZORAN y KRISTL, JULIJANA. Stability and Solubility of Trans-resveratrol are Strongly Influenced by pH and Temperature. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 93. 2015. Pag 197,198.
22. OCAMPO, JERSAIN.; OCHOA J., TATIANA. Identificación del Trans-Resveratrol de los epicarpios de *Vitis labrusca* por técnicas analíticas instrumentales. Universidad Santiago de Cali. Facultad de Ciencias Básicas. Programa de Química. 2011. Pág. 39
23. MARTINEZ, SARA. Compuestos Polifenolicos (Extraíbles y no Extraíbles) en alimentos de la dieta española: Metodología para su determinación e identificación. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Departamento de Bromatología II. Madrid 2010. Pág. 68
24. MILLER, N. James; MILLER, C. Jane. Estadística y Quimiometria para Química Analítica. 4ª Edición. Madrid: Prentice Hall, 2002. p. 125, 127
25. TESSIER, C; DAVID, J, THIS, P; BOURSIQOT, J y CHARRIER, A. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in Vitis vinifera L. Theor. Appl. Genet. 98. 2009. Pág. 171 - 177
26. RODRIGUEZ, M.A; GONZALEZ, G; GARCIA, F.J Y PEREZ, J.P. Contenido en Trans-resveratrol de los vinos tintos de Tenerife. Universidad de la Laguna. 2010 Pág. 89.



27. CALISAYA, JUAN C.; PAREDES, CAROLINA y DURAN, GIMENA. Cuantificación de Resveratrol en vinos mediante HPLC. Vol. 29. Universidad Mayor de San Andrés. 2012.
28. MACHADO M. MICHAEL; BOLIGON, ALINE; BARRIO, J. PABLO. Determination of polyphenol contents and antioxidant capacity of no – alcoholic red grape products (*Vitis labrusca*) from conventional and organic crops. Universidad Federal de Santa María, Av. Roraima – Brasil. Volumen 34 No. 5, 2011.
29. MACHADO M. MICHAEL; BOLIGON, ALINE; BARRIO, J. PABLO. Determination of polyphenol contents and antioxidant capacity of no – alcoholic red grape products (*Vitis labrusca*) from conventional and organic crops. Universidad Federal de Santa María, Av. Roraima – Brasil. Volumen 34 No. 5, 2011. Pág. 798 – 803.
30. ZUPANCIC, SPELA; LAVRIC, ZORAN y KRISTL, JULIJANA. Stability and Solubility of Trans-resveratrol are Strongly Influenced by pH and Temperature. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 93. 2015. Pág. 197,198.



9. ANEXOS

Anexo 1. Datos Curva Rango Alto

		CONCENTRACION (ppm)				
	No.	36	40	46	50	60
CURVA 1	1	6409048	7075920	8093276	8781659	10444815
	2	6404793	7073099	8094128	8796940	10440579
	3	6398420	7073512	8091214	8790901	10444748
	PROMEDIO	6404087	7074177	8092873	8789833	10443381
	DESVIACION	5349	1524	1498	7696	2427

Anexo 2. Datos Curva Rango Medio

CURVA No.	12 ppm	CONCEN. (ppm)	16 ppm	CONCEN. (ppm)	20 ppm	CONCEN. (ppm)	26 ppm	CONCEN. (ppm)	30 ppm	CONCEN. (ppm)
1	2249843	11,8	2926263	15,6	3619151	19,5	4644181	25,3	5415414	29,6
1	2249148	11,8	2926499	15,6	3620043	19,5	4644650	25,3	-	-
1	2247482	11,7	2922875	15,6	3620407	19,5	4646548	25,3	-	-
PROMEDIO	2248824	11,8	2925212	15,6	3619867	19,5	4645126	25,3	5415414	29,6
DESVIACION	1213	0,01	2028	0,01	646	0,00	1253	0,01	-	-
% CV	0,05	0,06	0,07	0,07	0,02	0,02	0,03	0,03	-	-
2	2387035	12,5	3082057	16,5	3849074	20,8	4932502	26,9	5613085	30,8
2	2384089	12,5	3080004	16,4	3849019	20,8	4936533	26,9	5604589	30,7
2	2379893	12,5	3078200	16,4	3845003	20,8	4934582	26,9	5606404	30,7
PROMEDIO	2383672	12,5	3080087	16,4	3847699	20,8	4934539	26,9	5608026	30,7
DESVIACION	3589	0,02	1930	0,01	2335	0,01	2016	0,01	4474	0,03
% CV	0,15	0,16	0,06	0,07	0,06	0,06	0,04	0,04	0,08	0,08
3	2257772	11,8	2982865	15,9	3655643	19,7	4727229	25,8	5417143	29,7
3	2263588	11,8	2982386	15,9	3654711	19,7	4726809	25,8	5418930	29,7
3	2262013	11,8	2978321	15,9	3650329	19,7	4724828	25,7	5418601	29,7
PROMEDIO	2261124	11,8	2981191	15,9	3653561	19,7	4726289	25,8	5418225	29,7
DESVIACION	3008	0,02	2497	0,01	2838	0,02	1282	0,01	951	0,01
% CV	0,13	0,14	0,08	0,09	0,08	0,08	0,03	0,03	0,02	0,02
PROMEDIO TOTAL	2297874		2995497		3707042		4768651		5480555	



Anexo 3. Datos Curva Rango Bajo

CURVA No.	2 ppm	CONCEN. (ppm)	4 ppm	CONCEN. (ppm)	6 ppm	CONCEN. (ppm)	8 ppm	CONCEN. (ppm)	10 ppm	CONCEN. (ppm)
1	385851	1,8	773560	3,9	1122839	5,8	1477301	7,7	1858040	9,8
1	389374	1,9	772205	3,9	1120763	5,8	1473724	7,7	1859147	9,8
1	387553	1,8	768380	3,9	1118077	5,8	1475667	7,7	1857192	9,7
PROMEDIO	387593	1,8	771382	3,9	1120560	5,8	1475564	7,7	1858126	9,8
DESVIACION	1762	0,01	2686	0,01	2388	0,01	1791	0,01	980	0,01
% CV	0,45	0,51	0,35	0,37	0,21	0,22	0,12	0,13	0,05	0,05
2	450900	2,2	805857	4,1	1221266	6,3	1581457	8,3	1964740	10,3
2	452497	2,2	802343	4,1	1218170	6,3	1581973	8,3	1967071	10,3
2	452967	2,2	804428	4,1	1219117	6,3	1581202	8,3	1968742	10,3
PROMEDIO	452121	2,2	804209	4,1	1219518	6,3	1581544	8,3	1966851	10,3
DESVIACION	1083	0,01	1767	0,01	1586	0,01	393	0,00	2010	0,01
% CV	0,24	0,27	0,22	0,23	0,13	0,14	0,02	0,03	0,10	0,10
3	401504	1,9	787411	4,0	1172110	6,1	1521119	7,9	1884248	9,9
3	401584	1,9	789238	4,0	1172500	6,1	1521130	7,9	1885209	9,9
3	401572	1,9	788328	4,0	1174511	6,1	1522073	7,9	1882305	9,9
PROMEDIO	401553	1,9	788326	4,0	1173040	6,1	1521441	7,9	1883921	9,9
DESVIACION	43	0,00	914	0,00	1288	0,01	548	0,00	1479	0,01
% CV	0,01	0,01	0,12	0,12	0,11	0,11	0,04	0,04	0,08	0,08
PROMEDIO TOTAL	413756		787972		1171039		1526183		1902966	

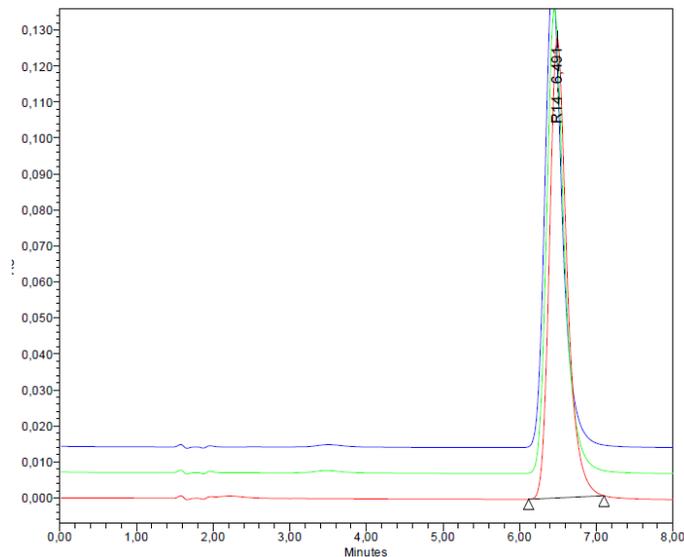


Figura 5. Cromatograma de la solución estándar de Trans-Resveratrol

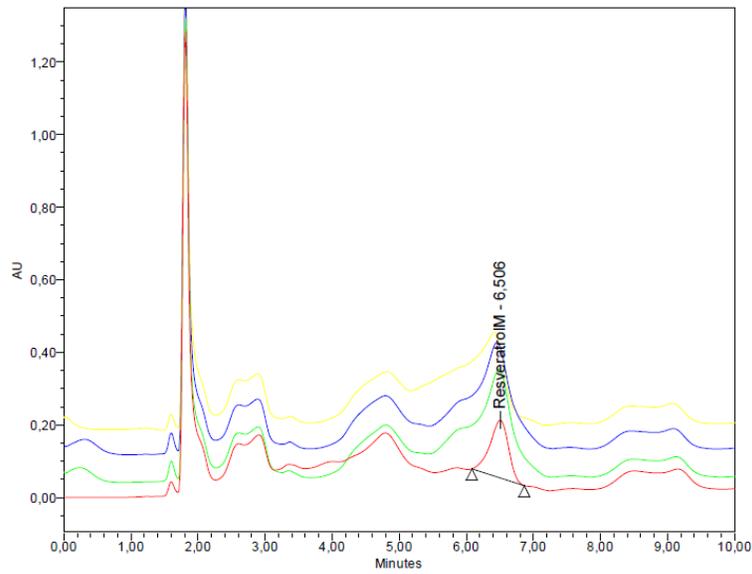


Figura 6. Cromatograma de la Muestra dopada

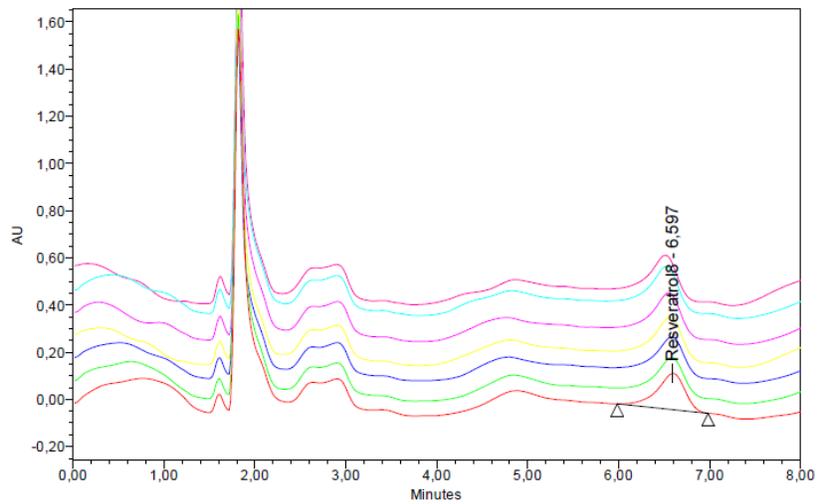


Figura 7. Cromatograma de las Muestra de Uva Isabella (*Vitis labrusca*) analizadas