

# DESARROLLO DE UN SISTEMA DE ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FIA) CON DETECCIÓN AMPEROMÉTRICA APLICANDO NANOTUBOS DE CARBONO EN VINOS BLANCOS

## DEVELOPMENT OF A FLOW INJECTION ANALYSIS (FIA) SYSTEM WITH AMPEROMETRIC DETECTION USING CARBON NANOTUBES IN WHITE WINES

Gabriel Alejandro Moreno Toasa <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Universidad Técnica de Ambato. Carrera de Biotecnología, Facultad Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Ecuador. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1976-8699>. Correo: [ga.morenot@uta.edu.ec](mailto:ga.morenot@uta.edu.ec)

Magdalena Sailema-Ortiz <sup>2</sup>

<sup>2</sup> Universidad Técnica de Ambato. Carrera de Biotecnología, Facultad Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Ecuador. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6092-194X>. Correo: [magdaliz\\_so@hotmail.com](mailto:magdaliz_so@hotmail.com)

Yagos Arias Carlos Jeanpier <sup>3</sup>

<sup>3</sup> Universidad de las Fuerzas Armadas. Carrera de Petroquímica, Departamento de Ciencias de la Energía y Mecánica. Ecuador. ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-4978-2574>. Correo: [cjyagos@espe.edu.ec](mailto:cjyagos@espe.edu.ec)

\* Autor para correspondencia: [ga.morenot@uta.edu.ec](mailto:ga.morenot@uta.edu.ec)

### Resumen

En la investigación se desarrolló una metodología analítica para el análisis de polifenoles totales en vinos, empleando un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) con detección amperométrica, utilizando un electrodo modificado con nanotubos de carbono multicapa. Para ello, se evaluó inicialmente el procedimiento de elaboración de dispersiones de MWCNTs, empleando polietilenimina como agente dispersante y su uso para la modificación de electrodos de carbono vítreo. Las condiciones de elaboración fueron: 0.50 mg·mL<sup>-1</sup> de concentración del nanomaterial, 0.25% (m/m) de PEI, 2000 J de energía de dispersión en PEI, centrifugación (2500 rpm; 20 min) y finalmente, redispersión en agua aplicando 2000 J de energía. Estos electrodos presentan menores potenciales de oxidación, mayor intensidad de pico y menores relaciones I/C, que los electrodos no modificados. Finalmente, se desarrolló esta metodología FIA

incorporando el electrodo optimizado [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)], con el fin de detectar y cuantificar polifenoles totales, obteniendo mejoras en la estabilidad, reproducibilidad, mayor sensibilidad y posibilidad de detección selectiva de estos compuestos, en el análisis de vinos blancos elaborados con dos tipos de uva: *Verdejo* y *Airén*. Esta metodología desarrollada, podría dar información adicional a partir de los índices electroquímicos, generando una alternativa de análisis a los estudios espectrofotométricos.

**Palabras clave:** FIA; Nanotubos de carbono (MWCNTs); Vino; Espectrofotometría; Electroanalítica

### Abstract

*The research developed an analytical methodology for the analysis of total polyphenols in wines, using a flow injection analysis system (FIA) with amperometric detection, using an electrode modified with multilayer carbon nanotubes. For this purpose, the procedure for the elaboration of MWCNTs dispersions, using polyethylenimine as dispersing agent and its use for the modification of glassy carbon electrodes, was initially evaluated. The processing conditions were: 0.50 mg-mL<sup>-1</sup> nanomaterial concentration, 0.25% (m/m) PEI, 2000 J of dispersion energy in PEI, centrifugation (2500 rpm; 20 min) and finally, redispersion in water applying 2000 J of energy. These electrodes show lower oxidation potentials, higher peak intensity and lower I/C ratios than the unmodified electrodes. Finally, this FIA methodology was developed incorporating the optimized electrode [GCE(PEI-Water/MWCNTs)], in order to detect and quantify total polyphenols, obtaining improvements in stability, reproducibility, greater sensitivity and possibility of selective detection of these compounds, in the analysis of white wines made with two types of grapes: Verdejo and Airén. This developed methodology could provide additional information from electrochemical indices, generating an alternative analysis to spectrophotometric studies.*

**Keywords:** FIA; Carbon nanotubes (MWCNTs); Wine; Spectrophotometry; Electroanalytical

**Fecha de recibido:** 21/10/2023

**Fecha de aceptado:** 08/12/2023

**Fecha de publicado:** 13/12/2023

### Introducción

El conocimiento y control de la distribución de polifenoles en vino, es un tema de gran importancia para la sociedad. Por ello, resulta de elevado interés el desarrollo de metodologías de análisis que permitan cuantificar el contenido total de polifenoles en los alimentos. Las técnicas electroanalíticas resultan adecuadas para el análisis de polifenoles, ya que muchos de estos compuestos pueden ser oxidados electroquímicamente a potenciales moderados (Moreno et al., 2023).

Este comportamiento electroquímico puede estar relacionado con las propiedades antioxidantes y su capacidad para donar electrones. Estas características permiten una detección electroquímica de polifenoles con cierta selectividad y buena sensibilidad, incluso en muestras complejas como el vino. El uso de estas técnicas presenta algunas ventajas frente a las metodologías espectrofotométricas de análisis de polifenoles,

como es la independencia de la señal frente a la longitud de paso óptico o la turbidez de la muestra (Blasco et al., 2007). Estas ventajas han llevado a la consideración de técnicas electroanalíticas como alternativas atractivas para el análisis de polifenoles (Sánchez et al., 2018).

La evaluación electroanalítica del contenido total de polifenoles ha sido realizada empleando tanto el barrido de potencial como los modos amperométricos (Dhroso et al. 2010). La voltamperometría cíclica es una herramienta muy útil para la evaluación y cuantificación de compuestos antioxidantes, ya que se fundamenta en la medición de la señal de oxidación mediante la aplicación de un barrido de potencial, siendo posible cuantificar la respuesta dada en valores de corriente (Barros; 2008), (Cosio; 2006). De esta manera, la presencia de señales voltamperométricas a bajo potencial se correlaciona con la presencia de polifenoles de alta actividad antioxidante, mientras que aquellos compuestos con bajo poder antioxidante muestran actividad electroquímica en potenciales más positivos. De hecho, diferentes clases de polifenoles pueden cuantificarse por separado procesando las señales a diferentes intervalos de potencial. Este concepto ha sido utilizado por otros autores para el análisis de diferentes fracciones de polifenoles en vinos utilizando electrodos basados en materiales de carbono (Aguirre et., 2010), (Seruga et al., 2011).

El análisis por inyección en flujo FIA, es una de las formas más avanzadas que el químico analítico tiene a su disposición para manipular disoluciones acuosas o mezclar reactivos sin intervención humana, disminuyendo los pasos de pretratamiento de muestra, miniaturizando metodologías con posibilidad de automatización, disminuyendo errores de manipulación y aumentando la precisión de los resultados. Dentro del campo de análisis de alimentos, donde el pre-tratamiento de la muestra suele ser laborioso y por lo tanto puede generar errores significativos en la cuantificación de los analitos, las determinaciones por FIA son una alternativa idónea. Por ello, la combinación de una metodología FIA con detección electroquímica en modo amperométrico, puede resultar muy útil para el análisis de polifenoles en muestras de vino. Además, la modificación de electrodos con nanotubos de carbono proporciona mejoras importantes en las propiedades electroanalíticas de estos dispositivos como: disminución del sobrepotencial aplicado para la detección; mejora en la estabilidad de la señal y una mayor resistencia a la pasivación (Banks y Compton; 2005), (Kachoosangi et al., 2009).

Esta mejora en las señales electroquímicas está relacionada con la estructura y propiedades eléctricas de estos nanomateriales (Banks y Compton; 2005), (Ambrosi et al., 2010), lo que mejora la cinética de transferencia de electrones e impide la aparición de ensuciamiento. De esta manera, se obtiene una notable mejora en la estabilidad y reproducibilidad de las señales durante el análisis de las muestras complejas como el vino logrando procesar un gran número de muestras. Estos nanomateriales son muy atractivos para el diseño de (bio) sensores electroquímicos (Wang; 2009). Es por ello, que la investigación propone el desarrollo de un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) con detección amperométrica aplicando nanotubos de carbono en vinos blancos.

## Materiales y métodos

### Reactivos y muestras

Los ácidos: gálico, ferúlico, cafeico y p-cumárico, y la catequina se adquirieron de Sigma- Aldrich (Madrid, España). Las disoluciones madre de polifenoles se prepararon disolviendo una cantidad apropiada del

compuesto en metanol (grado ambiental, Alfa Aesar, Barcelona, España). Todas las disoluciones madre se mantuvieron alejadas de la luz y se almacenaron bajo refrigeración. Se prepararon disoluciones diluidas diariamente a partir de estas disoluciones madre. La polietilenimina (PEI, Cat. No. P3143) se adquirió de Sigma (Madrid, España) y se disolvió en etanol: agua, Scharlau (Sentmenat, España).

La disolución reguladora (Tampón Acético/Acetato 0.10 M pH 4.5 conteniendo NaCl 100 mM) se preparó tomando un volumen apropiado de ácido acético glacial (densidad = 1.05 g·cm<sup>-1</sup>; 99.8% pureza; Scharlau, Sentmenat - España), añadiendo la masa correspondiente de NaCl, Panreac (Barcelona, España), posteriormente ajustando el pH 4.5 deseado con NaOH (Ródano, Italia) 1.0 M y llevándolo a un volumen final con agua ultrapura. Así mismo, los reactivos de Folin-Ciocalteu y carbonato de sodio se adquirieron de Sigma (Madrid, España). Todos los demás productos químicos fueron de grado analítico-reactivo. Se utilizó agua ultrapura ( $\rho > 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) de un sistema Elga Purelab Opción Q (ELGA LabWater, UK) para preparar todas las disoluciones (Moreno et al., 2023).

Los nanotubos de carbono multicapa en polvo (MWCNTs, 30±15 nm de diámetro, 5-20  $\mu\text{m}$  de longitud, pureza > 95% (m/m), tipo "tubo hueco", preparado por deposición química en fase vapor, con un contenido nominal de 1% (m/m) de Fe y 0.1% (m/m) de S, Lote. PD30L520-60805) se obtuvieron de NanoLab (MA, EE. UU.).

Por otra parte, se adquirieron muestras de vino blanco (Verdejo y Airén) tales como: NaveSur 2015, Flor de Vetus, Lágrimas de Prius, Rars romántica de Bardos, Viña lobón, Señorío de los Llanos, Cerro de los pastores y La llanura, obtenidos en diversos supermercados de la Comunidad de Madrid. Todas las muestras de vino fueron analizadas dentro de la primera semana después de la apertura.

### Instrumentación

Las mediciones electroquímicas se realizaron utilizando un analizador electroquímico  $\mu\text{AUTOLAB}$  tipo III controlado por el software GEPES 4.9.007 (Eco Chemie, Utrecht, Países Bajos). El sistema de análisis de inyección de flujo (FIA) constó de una bomba peristáltica (modelo ISM 834, ISMATEC, Alemania) conectada a una válvula de baja presión de cuatro vías Rheodyne tipo 5020 (Alltech, España) con un bucle de muestra de 100  $\mu\text{L}$ , y una celda electroquímica de flujo de tipo WALL-JET (modelo EA-1096, Metrohm, Herisau, Suiza). Las conexiones se realizaron con un tubo de PTFE de interconexión (0.8 mm de diámetro interno y 1.6 mm de diámetro externo). Como contraelectrodo y electrodo de referencia se emplearon un disco de oro y un electrodo de Ag/AgCl/KCl 3M (Metrohm), como electrodo de trabajo se utilizaron electrodos de carbono vítreo (GCE) de 3 mm de diámetro (modelo CHI104, Austin, TX, EE. UU.), tanto modificados con MWCNTs como sin modificar.

Las mediciones espectrofotométricas se llevaron a cabo utilizando un espectrofotómetro de doble haz (Jasco V-630, Japón), controlado por el software SPECTRA MANAGER 2.08.04. Los tratamientos de ultrasonidos para la preparación de las dispersiones se realizaron empleando una sonda de ultrasonido Sonics Vibra Cell (modelo VCX130; Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, EE. UU.).

### Procedimiento de medida

**Análisis electroquímicos:** Los experimentos de voltamperometría cíclica se llevaron a cabo utilizando una celda electroquímica con tres electrodos. Se emplearon diferentes electrodos de trabajo (GCE y GCE

modificado), un electrodo Ag/AgCl/NaCl 3M (BAS MF-2063) como electrodo de referencia y un alambre de platino (1 mm de diámetro) como electrodo auxiliar. Los electrodos de GCE se pulieron con alúmina de 0.3 y 0.05  $\mu\text{m}$  (Buehler, España) sobre una alfombra de pulido N° 407212 (Buehler, EE. UU.) y se sometieron a limpieza ultrasónica en agua durante 1 minuto antes de su uso. Mientras que, los GCE modificados se obtuvieron depositando el volumen apropiado de la dispersión de MWCNTs sobre la superficie GCE limpia y dejándola secar durante 24 horas a temperatura ambiente. Además, los GCE modificados se sometieron a 10 ciclos entre -0.20 y +1.10 V a 0.050V s<sup>-1</sup> en el electrolito soporte antes de cada experimento (Moreno et al., 2023).

La detección electroquímica utilizando un sistema FIA se realizó en modo amperométrico, aplicando un potencial de trabajo fijo. Se permitió que las corrientes de detección alcanzaran una línea base estable antes de la monitorización amperométrica. Los electrodos de trabajo se sometieron a los mismos procedimientos y modificaciones descritos para los experimentos voltamperométricos.

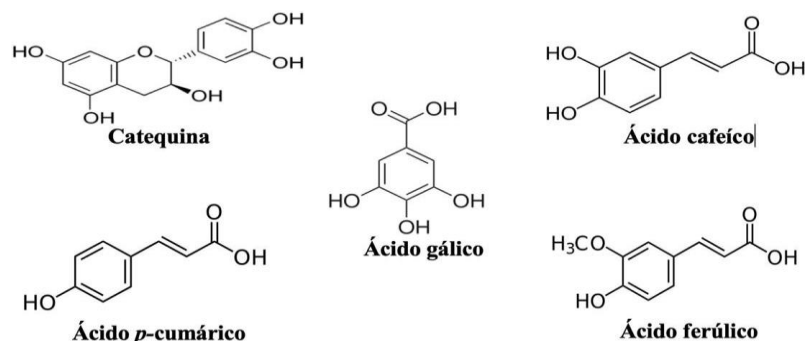
**Análisis espectrofotométricos:** Para realizar las medidas espectrofotométricas de las dispersiones de MWCNTs preparadas, estas se diluyeron previamente en agua (dilución 1:100). Las medidas se llevaron a cabo en cubetas de cuarzo (0.2 cm de paso óptico) y finalmente se registraron los espectros a longitud de onda comprendida entre 200 y 600 nm.

El ensayo de Folin-Ciocalteu (FC), se llevó a cabo siguiendo un método descrito 17, usando ácido gálico como patrón de referencia. Se mezclaron volúmenes adecuados de muestras de vino blanco diluidas o de ácido gálico estándar, con 0.50 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 1.0 mL de agua. Posteriormente, 1 minuto más tarde se añadió 2.0 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.9 M y la mezcla se llevó a un volumen final de 10.00 mL en un matraz volumétrico. Las disoluciones se mantuvieron en la oscuridad durante 2 horas y la absorbancia del complejo azul formado se midió a 755 nm en cubetas de cuarzo (1.0 cm de paso óptico). Las muestras de vino blanco (Verdejo y Airén), fueron diluidas 10 veces (1:10), antes de seguir el proceso descrito anteriormente. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente entre 20-25 °C.

## Resultados y discusión

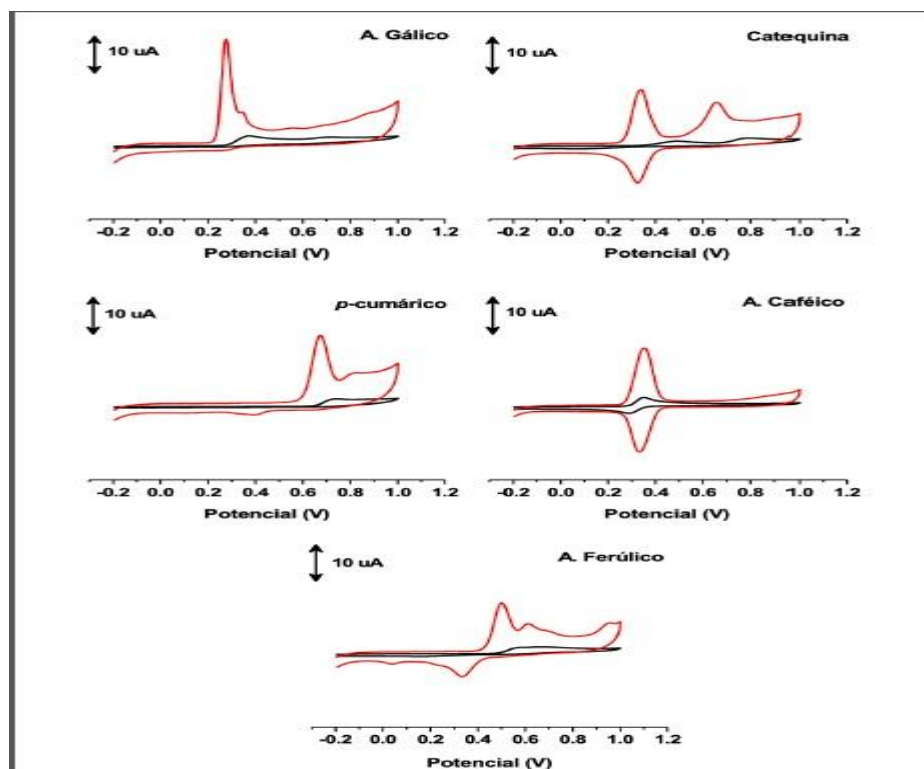
### Estudios de la respuesta voltamperométrica de polifenoles en el electrodo desarrollado

Una vez desarrollado el electrodo mediante la metodología de Moreno et al., (2023), se procedió a estudiar su respuesta electroquímica hacia otros polifenoles (ácido cafeico, ferúlico y *p*-cumárico, así como la catequina) los cuales se encuentran presentes en el vino. En la figura 1, se muestra la estructura química de cada uno de ellos.



**Figura 1.** Estructura de compuestos polifenólicos.

Para ello, se prepararon los electrodos de acuerdo con el procedimiento optimizado. A continuación, se registraron los voltamperogramas de barrido cíclico de cada uno de los polifenoles objeto de este estudio en concentraciones de  $1.00 \times 10^{-4}$  M a una velocidad de barrido de  $0.050 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$  en el GCE y en el electrodo desarrollado (Moreno et al., 2023). En la figura 2, se presentan las respuestas obtenidas para diferentes polifenoles, en las dos superficies de electrodos.



**Figura 2.** Voltamperogramas cíclicos de diferentes polifenoles: ácido gálico, ácido p-cumárico, ácido cafeico y ácido ferúlico, así como la catequina a  $1.00 \times 10^{-4}$  M y  $0.050 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ , medidos con electrodo GCE (*Negro*) y [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)] (*Rojo*).

Cuando se emplea el electrodo [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)] se observa mayores intensidad tanto en los picos anódicos como catódicos, en todos los polifenoles estudiados, en comparación con los obtenidos con el GCE sin modificar. Además, en el caso de los ácidos: gálico, *p*-cumárico, cafeíco y ferúlico, así como la catequina, existió una disminución en el potencial de pico correspondiente a la primera señal de oxidación cuando se utiliza el electrodo [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)].

En la tabla 1, se muestran los valores medios de los potenciales e intensidades de pico correspondientes a la primera señal de oxidación de todos los analitos, con la desviación estándar obtenida con tres superficies de electrodo diferente por triplicado, así como la intensidad de corriente capacitativa y la relación I/C con el electrodo modificado con MWCNTs y comparados con los valores obtenidos cuando se repite el estudio con el GCE sin modificar.

**Tabla 1.** Resultados de voltamperogramas de barrido cíclicos en polifenoles a  $1.0 \times 10^{-4}$  M y  $0.050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  en GCE y [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)].

Polifenoles	Electrodos	Potencial E [V]	Intensidad I [ $\mu\text{A}$ ]	Corriente capacitativa C [ $\mu\text{A}$ ]	I/C
<b>Ácido Gálico</b>	GCE	0.38±0.01	2.6±0.1	0.3±0.2	17±11
	GCE(PEI-Agua/MWCNTs)	0.279±0.002	33±4	1.2±0.3	28±4
<b>Catequina</b>	GCE	0.47±0.03	1.2±0.1	0.2±0.1	9±3
	GCE(PEI-Agua/MWCNTs)	0.339±0.001	15±1	0.9±0.2	17±3
<b>Acido <i>p</i>-cumárico</b>	GCE	0.75±0.02	1.9±0.1	0.16±0.05	12±4
	GCE(PEI-Agua/MWCNTs)	0.674±0.001	18±1	1.2±0.1	16±3
<b>Ácido cafeíco</b>	GCE	0.36±0.01	2.3±0.2	0.5±0.4	8±3
	GCE(PEI-Agua/MWCNTs)	0.351±0.001	16±1	0.8±0.1	21±4
<b>Ácido ferúlico</b>	GCE	0.663±0.001	1.7±0.1	0.20±0.02	8±1
	GCE(PEI-Agua/MWCNTs)	0.500±0.002	16±2	1.1±0.3	15±3

**Nota:** Los resultados son la media (n=3) ± desviación estándar.

En todos los casos existió un aumento considerable de las intensidades de pico anódicas cuando se emplea GCE modificado con MWCNTs, produciéndose también un incremento en la corriente capacitativa. A pesar de ello, los valores de la relación I/C son superiores en todos los casos a los obtenidos con GCE sin modificar. El aumento general de las intensidades observadas al utilizar [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)] podría explicarse como una consecuencia del aumento del área superficial del GCE una vez formada la capa de material nanoestructurado.

Si nos fijamos en los valores de potenciales de pico anódico obtenidos se puede observar que la presencia de MWCNTs en la superficie de GCE da lugar a un desplazamiento hacia potenciales de oxidación más favorables tanto en el caso de los ácidos: gálico ( $\Delta E=0.101 \text{ V}$ ), *p*-cumárico ( $\Delta E=0.08 \text{ V}$ ), cafeíco ( $\Delta E=0.009 \text{ V}$ ), y ferúlico ( $\Delta E=0.163 \text{ V}$ ), así como la catequina ( $\Delta E=0.131 \text{ V}$ ).

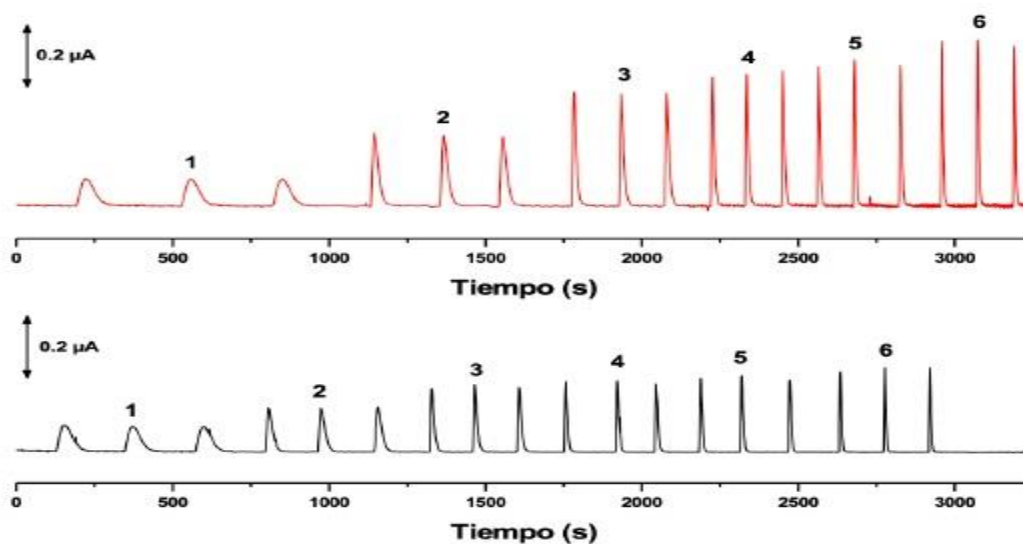
### Estudio en un sistema de inyección en flujo (FIA) con detección amperométrica.

Teniendo en cuenta las respuestas electroquímicas obtenidas, el electrodo [GCE(PEI- Agua/MWCNTs)] desarrollado, podría utilizarse como electrodo de trabajo en la optimización de un método para la determinación de polifenoles mediante un sistema de inyección en flujo FIA con detección amperométrica con el fin de obtener índices electroquímicos, definidos por las respuestas de los analitos a diferentes potenciales de detección, lo que permitiría distinguir diferentes grupos polifenólicos.

Para la optimización del método se estudiaron los parámetros más importantes en este tipo de técnica (FIA con detección amperométrica): las condiciones de flujo de electrolito portador y potencial de trabajo, empleando como electrodo de trabajo [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)] desarrollado, comparando los resultados con los obtenidos con un GCE sin modificar. Una vez optimizados estos parámetros, se estudiaron las características analíticas del método (sensibilidad, intervalos lineales y límites de detección y cuantificación) para los cinco polifenoles estudiados, comparando los resultados obtenidos con las dos superficies de electrodo.

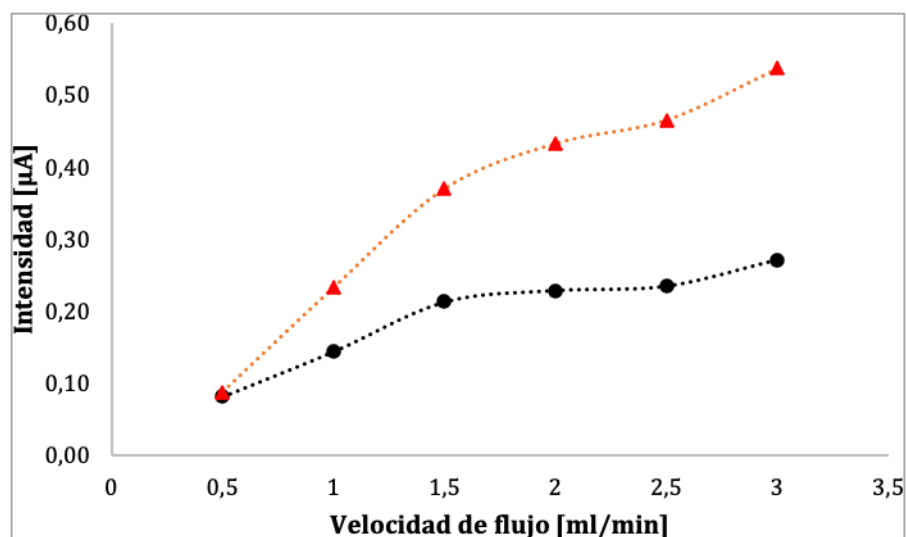
### Estudio de velocidad de flujo de trabajo

Uno de los parámetros más importantes en esta técnica de flujo es la velocidad de flujo de trabajo, por lo que se estudió su influencia en la señal electroquímica obtenida para ácido gálico  $1.00 \times 10^{-5}$  M a un potencial de trabajo de 0.600 V, utilizando como electrodo de trabajo el GCE y GCE modificado. Se analizaron velocidades de flujo de trabajo comprendidas entre  $0.50$  y  $3.00 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . En la figura 3, se muestran los diagramas obtenidos con las dos superficies de electrodo.



**Figura 3.** Diagramas obtenidos para el ácido gálico  $1.00 \times 10^{-5}$  M con dos superficies de electrodos: GCE (*Negro*) y [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)] (*Rojo*). Empleando diferentes velocidades de flujo:  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  (1),  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  (2),  $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  (3),  $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  (4),  $2.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  (5) y  $3.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  (6)

En la figura mostrada se observa que la intensidad de corriente aumenta y la anchura de pico disminuye a medida que la velocidad de flujo de trabajo se hace mayor, siendo el aumento de intensidad mayor a velocidades bajas, teniendo a estabilizarse cuando se supera una velocidad de  $1.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , tal y como puede observar en la Figura 4.



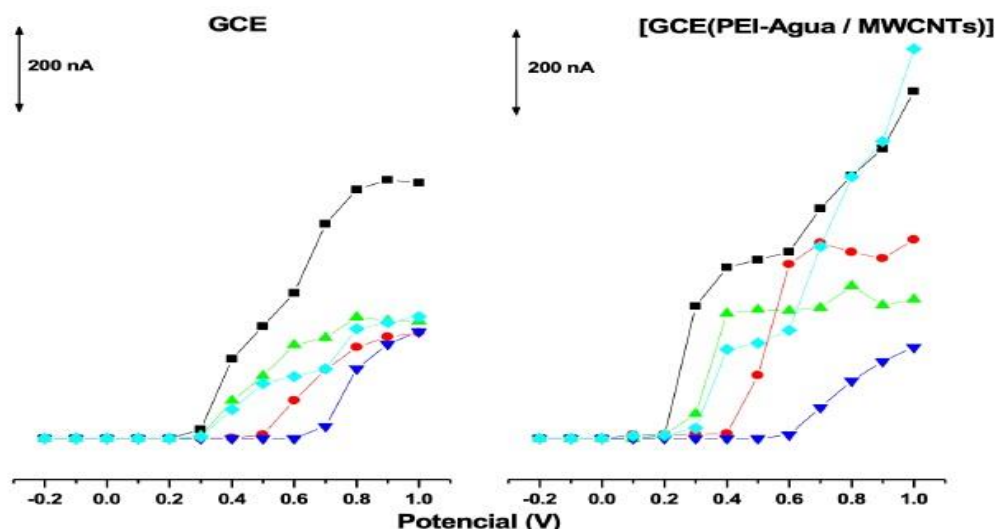
**Figura 4.** Velocidad de flujo del electrolito portador [ $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ] vs. Intensidad de señal [ $\mu\text{A}$ ] con dos superficies de electrodos. ●: GCE y ▲: [GCE (PEI-Agua/MWCNTs)].

Se eligió una velocidad de flujo de  $2.00 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , dado que: velocidades mayores no implican un aumento importante de intensidad de corriente, además evita el riesgo de pérdida del nanomaterial que se encuentra modificando el electrodo a velocidades de flujo muy elevadas y también evita el consumo excesivo de la disolución de electrolito portador con la cual estamos trabajando en el sistema de inyección en flujo.

### Evaluación de potencial de trabajo

El presente estudio evaluó el potencial de trabajo el cual influye directamente en la señal de intensidad de corriente de los distintos polifenoles (ácido gálico, catequina, ácido p-cumárico, ácido cafeico y ácido ferúlico). Para ello, se elaboraron los voltamperogramas hidrodinámicos, donde se registra la señal de intensidad de corriente obtenida con cada potencial de oxidación en un intervalo de trabajo de  $-0.20$  a  $1.00 \text{ V}$  en régimen hidrodinámico. Cada uno de los polifenoles se ha estudiado en una concentración de  $1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ , empleando la disolución reguladora como electrolito portador y una velocidad de flujo de  $2.00 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , como electrodo de trabajo se utilizó el GCE modificado con nanotubos [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)], así como GCE sin modificar.

En la figura 5, se presentan los voltamperogramas hidrodinámicos obtenidos para los distintos compuestos polifenólicos en las dos superficies de electrodos: GCE y GCE(PEI- Agua/MWCNTs).



**Figura 5.** Voltamperogramas hidrodinámicos con electrodo GCE y [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)] para diferentes polifenoles: ■: Ácido Gálico; ●: Ácido Ferúlico; ▲: Ácido Cafeíco; ▼: Ácido *p*-cumárico; y ◆: Catequina.

Los voltamperogramas hidrodinámicos obtenidos muestran una disminución del potencial de oxidación electroquímico en la mayoría de los polifenoles, cuando se trabaja con electrodos [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)], con relación a los obtenidos con GCE. La oxidación de ácido gálico, cafeíco y catequina en el GCE modificado se inicia entre 0.200 y 0.300 V, alcanzando un máximo de señal a unos 0.400 V, cuando no han empezado a oxidarse el ácido ferúlico y *p*-cumárico, respectivamente. Esto no ocurre en GCE, donde los máximos solo se alcanzan claramente a unos 0.800 V. Como consecuencia de la diferencia en los valores de potencial necesario para la oxidación de estos polifenoles, se podría llevar a cabo la detección selectiva de distintos grupos de polifenoles en el GCE modificado con MWCNTs.

Por esta razón, se podría definir tres grupos de compuestos polifenólicos en base a su dificultad de oxidación: fácilmente, moderadamente y difícilmente oxidables, empleando diferentes potenciales de detección (0.400; 0.600 y 0.800 V) que corresponden a fracciones totalmente definidas dentro de los compuestos polifenólicos. A 0.400 V, se obtiene una señal de intensidad de corriente, relacionada con la concentración de los compuestos fácilmente oxidables como: ácido gálico, cafeíco y catequina. Mientras que, a 0.600 V, se detectan simultáneamente los compuestos fácil y moderadamente oxidables (ácido gálico, cafeíco y ferúlico, así como la catequina). Finalmente, a 0.800 V se encuentran los polifenoles totales donde a los anteriores se incluyen también el ácido *p*-cumárico.

### Estudio de parámetros analíticos

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron disoluciones diluidas a diferentes concentraciones de cada uno de los polifenoles: 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300 y 400  $\mu\text{M}$ , en disolución reguladora (Tampón Acético/Acetato 0.1 M pH 4.5 conteniendo NaCl 100 mM). Los estudios se realizaron para los cinco polifenoles empleando tres potenciales de trabajo (0.400; 0.600 y 0.800 V). Cabe indicar, que no se obtuvo

señal electroquímica a 0.400 V para el ácido ferúlico, y de igual forma, paso lo mismo a 0.400 y 0.600 V para el ácido *p*-cumárico. Todas las disoluciones fueron inyectadas en el sistema por triplicado.

En las tablas 2 y 3, se muestra un resumen de los parámetros de calibración para los compuestos polifenólicos con los dos electrodos de trabajo. En ello, se muestran los valores de ordenada en el origen de la ecuación de la recta obtenida y la sensibilidad del método dada por la pendiente de la recta obtenida. En la tabla también se muestra el coeficiente de correlación lineal (*r*), intervalo lineal (IL), así como límite de detección (LD), obtenidos en cada caso. Los valores de señal para cada concentración corresponden a la media de las señales obtenidas en cada una de las tres inyecciones realizadas (Moreno et al., 2023).

**Tabla 2.** Parámetros analíticos de calibración para diferentes compuestos polifenólicos, empleando dos electrodos de trabajo: GCE

Polifenoles	Potencial E [V]	GCE				
		Ordenada[ $\mu$ A]	Pendiente [ $\mu$ A· $\mu$ mol <sup>-1</sup> ·L]	r	LD [ $\mu$ M]	IL [ $\mu$ M]
Ac. Gálico	0.400	0.02±0.03	0.01493±0.00006	0.998	0.33	1.09-75
	0.600	-0.01±0.02	0.03197±0.00004	0.990	0.16	0.52-100
	0.800	0.0000023±0.049	0.05066±0.00009	0.990	0.10	0.34-100
Ac. Cafeico	0.400	0.023±0.02	0.01093±0.00004	0.997	0.65	2.17-75
	0.600	0.0083±0.01	0.02266±0.00003	0.990	0.27	0.90-75
	0.800	-0.046±0.03	0.02602±0.00005	0.990	0.23	0.77-100
Catequina	0.400	0.004±0.007	0.005±0.00005	0.995	0.26	0.88-25
	0.600	0.021±0.01	0.01642±0.00002	0.990	0.06	0.19-100
	0.800	0.004±0.01	0.0049±0.00005	0.995	0.41	1.36-25
Ac. Ferúlico	0.600	0.008±0.01	0.01851±0.00009	0.998	0.11	0.35-25
	0.800	0.013±0.02	0.0184±0.001	0.996	0.11	0.36-25
Ac. Cumárico	0.800	0.042±0.08	0.0201±0.005	0.972	0.10	0.33-25

**Nota:** Los resultados son la media (n=3) ± desviación estándar

**Tabla 3.** Parámetros analíticos de calibración para diferentes compuestos polifenólicos, empleando dos electrodos de trabajo: [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)].

Polifenoles	Potencial E [V]	GCE(PEI-Agua/MWCNTs)				
		Ordenada[ $\mu$ A]	Pendiente [ $\mu$ A· $\mu$ mol <sup>-1</sup> ·L]	r	LD [ $\mu$ M]	IL [ $\mu$ M]
Ac. Gálico	0.400	0.04±0.05	0.0488±0.001	0.990	0.49	1.63-75
	0.600	0.02±0.05	0.0505±0.001	0.990	0.39	1.29-75
	0.800	-0.022±0.07	0.0714±0.002	0.990	0.21	0.70-75
Ac. Cafeico	0.400	0.036±0.05	0.049±0.001	0.990	0.24	0.81-100
	0.600	-0.018±0.04	0.02856±0.00007	0.998	0.34	1.12-100
	0.800	-0.017±0.03	0.02799±0.00005	0.990	0.63	2.10-100

<b>Catequina</b>	0.400	0.007±0.009	0.01805±0.00002	0.990	0.74	2.46-100
	0.600	0.013±0.02	0.01919±0.00003	0.990	0.83	2.76-100
	0.800	0.098±0.06	0.037±0.001	0.997	0.55	1.82-75
<b>Ac. Ferúlico</b>	0.600	0.041±0.05	0.031±0.002	0.997	0.46	1.55-50
	0.800	0.024±0.02	0.03163±0.00009	0.990	0.43	1.44-50
<b>Ac. Cumárico</b>	0.800	0.0719±0.06	0.039±0.002	0.997	0.30	1.00-50

**Nota:** Los resultados son la media (n=3) ± desviación estándar

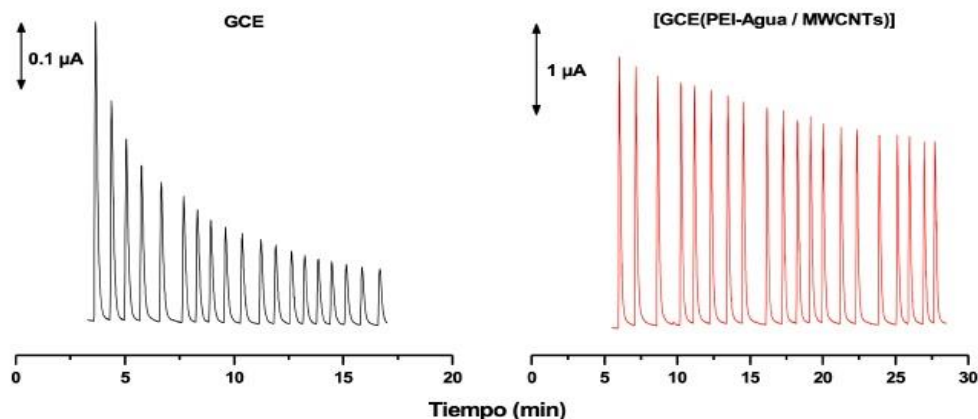
En base a lo mostrado, es importante mencionar que existe un aumento progresivo de la señal de picos al aumentar la concentración del polifenol, en el electrodo GCE modificado con MWCNTs, cosa que rápidamente se deja de observar en el GCE a potenciales mayores de 0.600 V, especialmente al medir ácido ferúlico y *p*-cumárico. Por otra parte, la respuesta lineal en todos los casos es más extensa al emplear el GCE modificado con los MWCNTs.

Así mismo, estos resultados muestran que los valores de ordenada en el origen obtenidos de la ecuación de la recta son cercanos a cero, para ambos electrodos, mientras que las pendientes son relativamente mayores aumentando la sensibilidad del método al emplear GCE modificado con MWCNTs en comparación al electrodo GCE sin modificar. Por último, los límites de detección (LD) son similares porque hay un aumento en la corriente capacitativa de los MWCNTs que compensa el aumento en la sensibilidad.

#### **Aplicación a la cuantificación de polifenoles en vinos Estudio de estabilidad de la señal**

En este estudio se evaluó la estabilidad de la respuesta obtenida con los electrodos en el análisis de muestras de vino blanco a potenciales de trabajo elevados. En estas condiciones, la presencia de polifenoles en el vino combinada con otras sustancias orgánicas y sales minerales puede producir una disminución progresiva de la respuesta del electrodo, debido a los procesos electroquímicos que involucran a estas sustancias. Como consecuencia de todo ello, puede aparecer interferencias en el análisis, llegando incluso a inhabilitar el electrodo y en algunos casos obligar a la regeneración de la superficie.

Para llevar a cabo el estudio, se ha utilizado una muestra de vino blanco diluido 1:10, en disolución reguladora, medido en un sistema FIA al cual se aplicó 0.800 V como potencial de trabajo, ya que a este potencial todos los compuestos polifenólicos estudiados son detectables. En la figura 6, se presenta un estudio de estabilidad de señal en vino blanco, obtenidos para un GCE y GCE(PEI-Agua/MWCNTs). El resultado es el producto de 20 inyecciones consecutivas de una muestra de vino blanco.



**Figura 6.** Estudio de estabilidad de señal en vino blanco mediante un sistema de inyección de flujo FIA en disolución reguladora (Tampón Acético/Acetato 0.1 M pH 4.5 conteniendo NaCl 100 mM), utilizando dos superficies de electrodo: GCE (*negro*) y GCE modificado (*rojo*).

Se puede observar un aumento en la intensidad de señal al emplear electrodos GCE modificado, esto podría estar relacionado a un aumento del área superficial activa del electrodo por parte de los nanotubos de carbono. Además, existe una pérdida muy rápida de señal en GCE, donde solo mantiene un 20% de señal inicial, frente al 73% del GCE modificado, esto se debe a la acumulación de los productos de oxidación electroquímica de los compuestos polifenólicos presentes en el vino, responsables principales de la pérdida de señal. Finalmente, se puede utilizar el GCE modificado con MWCNTs durante un tiempo razonable, mientras que el GCE sin modificar habría que regenerarlo a la tercera inyección.

### Cuantificación de polifenoles en vinos blancos

En este estudio se analizaron vinos blancos elaborados con dos tipos de uva: “Verdejo” y “Airén”, evaluando el contenido de polifenoles a los tres potenciales seleccionados, expresados como concentración de ácido gálico equivalente (EAG).

Todas las muestras analizadas fueron diluidas 10 veces en la disolución reguladora (Tampón Acético/Acetato 0.1 M pH 4.5 conteniendo NaCl 100 mM). Dos muestras de cada vino diluido fue inyectado por triplicado, inyectando entre cada una de las muestras una disolución de ácido gálico 50  $\mu\text{M}$  para evaluar y corregir posibles variaciones en la intensidad de las señales. Así mismo, las mismas muestras de vino fueron analizadas espectrofotométricamente empleando el método oficial de análisis de polifenoles totales en vinos (OIV; 2017). En la tabla 4, se muestran los valores de EAG ( $\text{mg L}^{-1}$ ) empleando las dos metodologías analíticas: Folin-Ciocalteu y FIA, en distintas muestras de vino blanco, las cuales están elaboradas con dos tipos de uva: Verdejo y Airén. El resultado es el correspondiente a tres inyecciones consecutivas de muestras de vino blanco, para cada potencial de oxidación.

**Tabla 4.** Resultados de equivalente de ácido gálico en ( $\text{mg L}^{-1}$ ), obtenidos por Folin-Ciocalteu (FC) y FIA, en muestras de vino blanco.

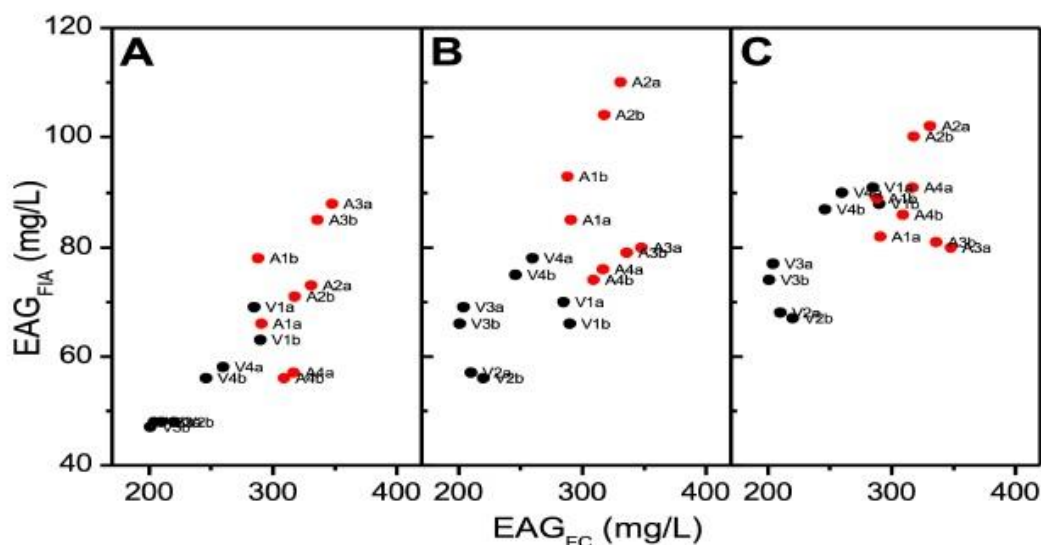
Vino blanco	Tipo de uva	Muestra	Equivalente ácido gálico [ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ]			
			FC	FIA		
				0.400 V	0.600 V	0.800 V
NaveSur 2015	Verdejo	V1a	285	69	70	91
		V1b	296	63	66	88
Flor de Vetus	Verdejo	V2a	210	48	57	68
		V2b	220	48	56	67
Lágrimas de Prius	Verdejo	V3a	204	48	69	77
		V3b	201	47	66	74
Rars romántica de Bardos	Verdejo	V4a	260	58	78	90
		V4b	246	56	75	87
Viña Lobón	Airén	A1a	291	66	85	82
		A1b	288	78	93	89
Señorío de los Llanos	Airén	A2a	331	73	110	102
		A2b	318	71	104	100
Cerro de los pastores	Airén	A3a	348	88	80	80
		A3b	336	85	79	81
La Llanura	Airén	A4a	317	57	76	91
		A4b	309	56	74	86

Los resultados manifiestan que los valores obtenidos por FC son mayores a los obtenidos electroquímicamente mediante FIA. Es importante mencionar que el método espectrofotométrico, se basa en la reducción del  $\text{Mo}^{6+}$  a  $\text{Mo}^{5+}$ , por todos aquellos compuestos reductores que se encuentren en una muestra. En el caso del vino, no solo los polifenoles son capaces de reducir al  $\text{Mo}^{6+}$ , sino también los azúcares, ácidos orgánicos o alcoholes (entre otros) también lo hacen. Por lo tanto, el resultado obtenido por FC suele proporcionar valores EAG mayores que con otras metodologías para el análisis de polifenoles totales. En este caso, los resultados obtenidos de EAG de FC, se encuentran dentro del intervalo habitual para vinos blancos (Sánchez-Arribas 2012).

La señal electroquímica es más específica dado que principalmente es debida a la actividad electroquímica de los polifenoles, especialmente si el potencial de detección no es excesivamente alto. En general, se observa que los vinos elaborados con uva “Airén” proporciona valores de EAG mayores que los vinos de uva “Verdejo”. Según los ensayos electroquímicos, parece ser que los vinos “Airén” contienen mayor cantidad de polifenoles de oxidación moderada (con electroactividad parecida a la del ácido ferúlico) que los vinos de uva verdejo.

#### Evaluación de la correlación de los resultados electroquímicos con resultados espectrofotométricos

Finalmente, en este estudio se compararon los resultados obtenidos mediante el método FC con los correspondientes a los índices electroquímicos. Para ello, se realizaron los estudios de regresión de los resultados cuyos gráficos se muestran en la figura 7.



**Figura 7.** Correlación entre los índices electroquímicos obtenidos por FIA a 0.400 V (A), 0.600 V (B) y 0.800 V (C) frente a los espectrofotométricos obtenidos por Folin-Ciocalteu. ●: Vino blanco con uva tipo “Verdejo” y ●: Vino blanco con uva tipo “Airén”.

Se observa, que existe una buena correlación entre los resultados espectrofotométricos y electroquímicos en todos los casos, obteniéndose coeficientes de correlación ( $r$ ) de 0.84 para el índice electroquímico a 0.400 V y 0.65 para los índices a 0.600 y 0.800 V. Esto permite afirmar que ambos métodos analíticos proporcionan información cualitativa similar.

Por lo tanto, la metodología electroquímica proporciona resultados de relevancia cualitativa similar al método FC, pero con las ventajas de la mayor especificidad (la señal electroquímica es más selectiva a los polifenoles) y rapidez a la hora de procesar las muestras. Además, los resultados parecen indicar que los índices electroquímicos proporcionan información adicional del contenido de clases de polifenoles que parecen indicar diferencias entre los vinos elaborados con uvas “Airén” y “Verdejo”, especialmente según los índices de 0.400 y 0.600 V. Todo esto pone de manifiesto a la utilidad de la metodología propuesta para la estimación del contenido de polifenoles en este tipo de muestras.

## Conclusiones

Se obtuvieron electrodos modificados con dispersiones de MWCNTs, obteniéndose superficies más homogéneas que proporcionan mejores resultados voltamperométricos para los ácidos: gálico, cafeico, ferúlico y *p*-cumárico, así como la catequina. Estos sensores electroquímicos permitieron desarrollar una metodología analítica para el análisis de polifenoles totales en vinos, utilizando un sistema FIA con detección amperométrica a diferentes potenciales de oxidación (0.400, 0.600 y 0.800 V).

Se compararon los resultados obtenidos mediante ambas metodologías analíticas: *Folin-Ciocalteu* y *FIA*, obteniendo información cualitativa similar. El método electroquímico, proporciona mayor estabilidad,

reproducibilidad, sensibilidad, selectividad de polifenoles y rapidez de análisis, generando una alternativa a los estudios espectrofotométricos.

Los resultados del contenido de polifenoles obtenidos mediante los índices electroquímicos podrían distinguir vinos blancos elaborados con dos tipos de uvas: “Verdejo” y “Airén”, los cuales podrían ser utilizados en futuras investigaciones.

## Referencias

- Aguirre, M. J., Chen, Y. Y., Isaacs, M., Matsuhiro, B., Mendoza, L., & Torres, S. (2010). Electrochemical behaviour and antioxidant capacity of anthocyanins from Chilean red wine, grape and raspberry. *Food Chemistry*, 121, 44–48.
- Ambrosi, A., Sasaki, T., & Pumera, M. (2010). Platelet graphite nanofibers for electrochemical sensing and biosensing: The influence of graphene sheet orientation. *Chemistry an Asian Journal*, 5, 266–271.
- Banks, C. E., & Compton, R. G. (2005). Exploring the electrocatalytic sites of carbon nanotubes for NADH detection: An edge plane pyrolytic graphite electrode study. *Analyst*, 130, 1232–1239.
- Barros, L., (2008) Antioxidant activity of *Agaricus sp. mushrooms* by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chemistry*, 111: 61–66.
- Blasco, A. J., González Crevillén, A., González, M. C., & Escarpa, A. (2007). Direct electrochemical sensing and detection of natural antioxidants and antioxidant capacity in vitro systems. *Electroanalysis*, 19, 2275–2286.
- Cosio, M.S., (2006). Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family, *Food Chemistry*, 97, 725-731.
- Dhroso, A., Laschi, S., Marrazza, G., & Mascini, M. (2010). A fast electrochemical technique for characterization of phenolic content in wine. *Analytical Letters*, 43, 1190–1198.
- Kachoosangi, K. T., Musameh, M. M., Abu-Yousef, I., Yousef, J. M., Kanan, S. M., Xiao, L., (2009). Carbon nanotube-ionic liquid composite sensors and biosensors. *Analytical Chemistry*, 81, 435–442.
- Moreno G., Moya E., Vizuet G., Yagos C., & León W., (2023). Desarrollo de electrodos modificados con nanotubos de carbono multicapa (MWCNTs) para la determinación de polifenoles. *Polo del conocimiento*. 85 (8): 1-26
- OIV, Oficina Internacional de la Viña y el Vino. Disponible en: <http://www.oiv.int/oiv/info/esmethodesanalyses?lang=es>. Acceso 7 sep.2017.
- Sánchez-Arribas A., Martínez-Fernández M., & Chicharro M., (2012). The role of electroanalytical techniques in analysis of polyphenols in wine. *Trends in Analytical Chemistry*. 34: 78-96.
- Sánchez-Arribas A., Moreno M., Moreno G., Bermejo E., Zapardiel A., & Chicharro M., (2018). Characterization of White Wines by Electrochemical Indexes Obtained Using Carbon nanotube-modified electrodes. *Electroanalysis*. 30: 1-12

- Seruga, 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 Chemistry*, 124, 1208–1216.
- Wang, X., (2009). Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. *Food Chemistry*, 112, 454–460.