

Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* del vino y valoración de sus efectos *in vivo*

M^a Soledad Fernández-Pachón, Débora Villaño, Ana M^a Troncoso y M^a Carmen García-Parrilla

Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. Sevilla. España

RESUMEN. El objetivo de esta revisión es el estudio de la actividad antioxidante del vino, analizando los distintos métodos que se han empleado en su evaluación. Esta actividad se relacionará, tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo, con el perfil de compuestos polifenólicos presentes en el vino. Los vinos tintos presentan actividades superiores a los blancos y la magnitud de dichos valores varía en función del método de análisis empleado. No existe un único compuesto polifenólico responsable mayoritariamente de la actividad antioxidante del vino, sino que ésta se explica por el conjunto de todos ellos. Para evaluar la influencia del consumo de vino tinto en el organismo humano se ha utilizado como biomarcador más frecuente la capacidad antioxidante del plasma, que incrementa su valor tras la ingesta del vino. Se expone que la evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* del vino requiere el uso de diversos métodos que proporcionen una información diferente y complementaria. Los métodos *in vivo* tienen la ventaja de valorar las transformaciones metabólicas que sufren los fenoles en el organismo y que modifican su actividad. De los estudios realizados hasta la fecha se concluye que el vino interviene en la capacidad antioxidante del plasma de forma directa a través de sus compuestos polifenólicos e indirecta al aumentar la concentración plasmática de ácido úrico. **Palabras clave:** Compuesto fenólico, vino, método de medida de actividad antioxidante, capacidad antioxidante del plasma, humano, ácido úrico.

INTRODUCCION

Las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) son especies químicas radicales y no radicales que debido a su inestabilidad se comportan como agentes oxidantes. Las ROS pueden tener en nuestro organismo un origen endógeno relacionado con el metabolismo del oxígeno y con distintas reacciones de defensa de nuestro sistema inmunológico. También pueden provenir de fuentes externas: el tabaco, la contaminación del aire, la radiación ultravioleta y la de alta energía, el ozono o ciertos medicamentos. El organismo dispone de mecanismos de defensa antioxidante frente a las especies reactivas de oxígeno, que comprenden sistemas enzimáticos y no enzimáticos (1). Ciertas enzimas como superóxido dismutasa, catalasa,

SUMMARY. Review of the different methods for the evaluation of the *in vitro* antioxidant activity of wine and study of *in vivo* effects. The aim of this paper is to evaluate the significance of these methods, as well as to correlate the antioxidant activity of wines with their phenolic profile, both in qualitative and quantitative terms. Red wines show higher antioxidant capacities than white ones and the magnitude of these differences depends on the method used. The antioxidant activity of wine can not be mainly ascribed to a particular phenolic compound, instead it is explained by the global interaction of all of them. To evaluate the influence of red wine consumption in the human organism, plasma antioxidant capacity has been frequently used as biomarker, and studies have shown that it increases after wine ingestion. We can conclude that it is necessary to use a battery of methods that provide different and complementary information to properly interpret the results. Phenolic compounds undergo metabolic transformations in the organism which modify their activities. *In vivo* assays do consider these changes. From the studies performed up to date we can conclude that acute ingestion of wine directly acts on plasma antioxidant capacity due to phenolic compounds and indirectly influences by means of changes on plasmatic concentration of endogenous antioxidants.

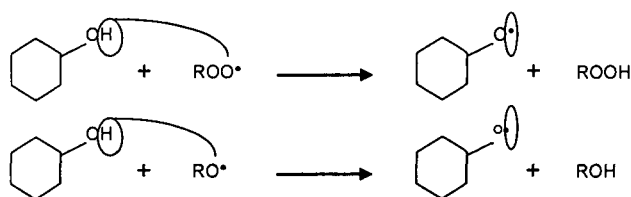
Keywords: Phenolic compound, wine, measurement method of antioxidant activity, plasma antioxidant capacity, human, uric acid.

glutación peroxidasa o glutación reductasa, neutralizan las especies reactivas. Los sistemas defensivos no enzimáticos abarcan una serie de compuestos antioxidantes como albúmina, ceruloplasmina, transferrina, glutación, bilirrubina, ácido úrico, ubiquinona o melatonina. En ciertas situaciones extremas, estas defensas no son suficientes y las especies reactivas producen daño oxidativo, tanto en biomoléculas como en componentes celulares (2,3).

El daño oxidativo se relaciona con el origen y desarrollo de ciertas enfermedades multifactoriales de carácter crónico, como la oxidación de las LDL y la enfermedad cardiovascular (4), el daño oxidativo al ADN y el cáncer (5,6) y la oxidación de las proteínas de las lentes oculares y la alteración de la visión (7,8).

La ingesta de alimentos ricos en sustancias antioxidantes como vitaminas C y E, carotenoides o compuestos fenólicos, previene o disminuye el desarrollo de estas enfermedades (9-12). Se cree que la dieta aumenta la defensa antioxidante del organismo evitando el daño oxidativo.

Los compuestos fenólicos son sustancias orgánicas ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Se sintetizan como metabolitos secundarios con funciones de defensa, y son en gran medida responsables de las propiedades del color, la astringencia y el flavor (sabor y aroma) de los vegetales. Se encuentran en las verduras y frutas, y en productos derivados como el vino o la cerveza. Todos tienen en su estructura uno o más anillos aromáticos con al menos un sustituyente hidroxilo (13). Su estructura química es propicia para secuestrar radicales libres, debido a la facilidad con la que el átomo de hidrógeno desde el grupo hidroxilo aromático puede ser donado a la especie radical, y a la estabilidad de la estructura quinona resultante que soporta un electrón desapareado (14).



La actividad antioxidante de los polifenoles depende del número y la localización de los grupos hidroxilo que contiene en su estructura (15,16).

Además de su actividad antioxidante, se han atribuido otras propiedades biológicas a los compuestos fenólicos: inhiben la agregación plaquetaria (17) y ejercen como agentes vasorrelajantes (18), antiinflamatorios (19) y anticancerígenos (11,20,21).

Uvas y vinos presentan una gran variedad de compuestos fenólicos de muy diversas estructuras químicas y pesos moleculares, cuya cantidad total y la proporción en que aparecen dependen de una serie de factores, como la variedad de la uva, el área de producción, la añada, la climatología, las técnicas agrícolas, los métodos de vinificación, el procedimiento de prensado de la uva y el tiempo de fermentación del mosto con la piel y las semillas.

Los compuestos fenólicos de la uva se localizan en las partes sólidas: piel, semilla y tejido vascular. En la pulpa destaca la presencia de ácidos fenólicos y sus derivados. Los flavonoles y antocianos se encuentran localizados en las células del hollejo de la uva, siendo éstos últimos responsables del color rojo de los vinos tintos. Las procianidinas y flavan3-oles se localizan en las semillas de las uvas. En los vinos blancos los fenoles mayoritarios son aquellos procedentes de la pulpa, mientras que en los tintos, la maceración alcohólica de los hollejos y las semillas permite la liberación y solubilización de los flavonoides.

La "Paradoja Francesa" constituyó un interesante punto de partida, al mostrar cómo en Francia existe un riesgo bajo de padecer enfermedades cardiovasculares en la población a

pesar del elevado consumo de grasas saturadas de origen animal. Se descubrió que la dieta de los franceses difiere de la de otros países desarrollados por el consumo de vino tinto (22). Numerosos estudios epidemiológicos que relacionan el consumo moderado y regular de vino con una disminución del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, crónicas y degenerativas se realizaron a raíz de esta observación (23-25).

El objetivo de esta revisión es el estudio de la actividad antioxidante del vino, analizando los distintos métodos que se han empleado en su evaluación. Esta actividad se correlacionará, tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo, con el perfil de compuestos polifenólicos presentes en el vino.

Actividad antioxidante

Comparación de los métodos de medida de la actividad antioxidante del vino: ventajas e inconvenientes

Los métodos de determinación de la actividad antioxidantes se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o la muestra. Por otra parte, hay ensayos que se basan en la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo.

Los distintos métodos difieren en el agente oxidante, en el sustrato empleado, en la medida del punto final, en la técnica instrumental utilizada y en las posibles interacciones de la muestra con el medio de reacción. Además, los objetivos de los diferentes métodos de medida son diversos. Entre ellos señalamos la medida de la resistencia de un alimento a la oxidación, la evaluación cuantitativa del aporte en sustancias antioxidantes o la evaluación de la actividad antioxidante del plasma una vez ingerido el alimento (26-30).

Los métodos *in vitro* son útiles para comparar la actividad antioxidante de diferentes muestras de alimentos. Los resultados son limitados desde un punto de vista nutricional, ya que no reproducen la situación fisiológica. Para alcanzar una mayor aproximación algunos ensayos incluyen radicales relevantes en los sistemas biológicos (O_2 , H_2O_2 , ROO , OH) (31).

Por otra parte, la actividad antioxidante de un alimento *in vitro* difiere de su efecto antioxidante *in vivo*, ya que las transformaciones metabólicas que sufren los compuestos antioxidantes en el organismo modifican su actividad. Ciertos compuestos fenólicos poliméricos que presentan una baja actividad *in vitro* pueden, sin embargo, contribuir a la capacidad antioxidante del plasma después de su transformación metabólica en compuestos más simples. Así, dos muestras de té verde y negro, que daban resultados muy diferentes en experiencias *in vitro*, produjeron, tras su consumo, un incremento similar en la capacidad antioxidante del plasma (32).

Por ello es importante tener en consideración aspectos como el grado de absorción de los compuestos, los productos del metabolismo que generan y la actividad de los mismos.

Las medidas *in vivo* pueden reflejar las posibles interacciones entre los distintos componentes de la dieta. Sin embargo, existen numerosos aspectos aún desconocidos en las medidas *in vivo*, como el modo de acción de los radicales dentro de los compartimentos celulares y si los compuestos antioxidantes se transportan al interior de los mismos (33).

En la Tabla 1 se resumen las características más relevantes de los métodos de medida de actividad antioxidante del vino que han sido usados con mayor frecuencia (28, 31,32,34-50).

Especies reactivas

La mayoría de los métodos de medida de la actividad antioxidante no emplean especies radicales de significado biológico. Son radicales ajenos al organismo el DPPH• o el ABTS²⁺. En el caso del ensayo FRAP el Fe²⁺ producido en la reacción redox del ensayo FRAP puede reaccionar con H₂O₂ para producir OH, que se considera el radical libre más dañino encontrado *in vivo*. Por otra parte, hay antioxidantes que pueden inhibir la oxidación lipídica a través de la quelación de metales de transición que intervienen en la producción de radicales libres (51). El empleo de radicales peroxilo o hidroxilo en ensayos como ORAC, TRAP, TOSC, DCFH-DA les añade un mayor significado biológico, ya que estas ROS son las más importantes a nivel fisiológico (33).

Sustrato diana

Los primeros métodos diseñados para medir la actividad antioxidante se centraron en la protección frente a la oxidación de lípidos (52), con el inconveniente de que sólo detectan un estado avanzado del daño oxidativo. El ensayo ORAC usa como diana a una proteína (ficoeritrina) que, por su sensibilidad, permite evaluar los pasos iniciales del proceso de oxidación.

Posibilidad de interferencias

Se pueden producir interacciones entre la especie que genera los radicales y los compuestos antioxidantes de la muestra. Se pueden evitar estas interferencias si existe una elevada razón molar entre la especie radical y la muestra, como ocurre en los ensayos que emplean AAPH o ABAP. Así, estos métodos muestran mayor sensibilidad y especificidad.

También se pueden producir interacciones entre el sustrato de la reacción de oxidación y la muestra alterando los resultados. La oxidación de luminol produce radicales que emiten luz. Los compuestos antioxidantes no sólo reducen los radicales producidos por AAPH, sino también los radicales luminol.

Los métodos espectrofotométricos basados en la absorbancia a una longitud de onda pueden presentar interferencias debidas a compuestos coloreados presentes en los alimentos. Este es un factor importante a considerar cuan-

do se analiza la actividad antioxidante del vino tinto (53). Los métodos fluorimétricos no presentan este problema.

Sensibilidad del método

El método quimioluminiscente (Ensayo basado en luminol) tiene un límite de detección inferior al de los ensayos espectrofotométricos (ABTS, DPPH, FRAP, Ensayo basado en crocina) (54). Las medidas de voltametría cíclica también presentan una sensibilidad relativamente baja.

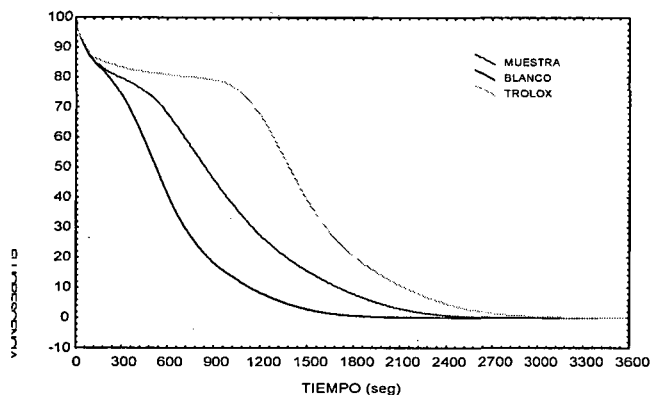
Medio de reacción hidrosoluble/liposoluble

La mayor parte de los métodos de medida de la actividad antioxidante miden solamente compuestos solubles en agua debido a las naturalezas hidrofílicas de las especies reactivas y de los sustratos oxidables que emplean. Algunos ensayos pueden adaptarse para medir antioxidantes lipofílicos: ORAC (55,56), ABTS (57) y el ensayo TRAP (58).

Tipo de determinación

Hay métodos (TRAP, ABTS, FRAP) que cuantifican la actividad antioxidante el porcentaje de inhibición a un tiempo fijo, con el handicap de que distintos antioxidantes pueden tener un mismo porcentaje a un tiempo dado pero distinto a otro tiempo determinado. Otros métodos miden la extensión del tiempo de inhibición a un porcentaje de inhibición fijo (30). En cambio, el ensayo ORAC desarrolla la reacción de la especie reactiva con el sustrato oxidable hasta el final y usa la técnica del área bajo la curva de descenso (AUC) para la cuantificación, que integra los porcentajes de inhibición sobre el período de tiempo completo que dura la inhibición (Figura 1).

FIGURA 1
Fluorescencia relativa de β -Ficoeritrina incubada con AAPH frente al tiempo en presencia de tampón fosfato (blanco), trolox (20 μ M) o una muestra



El valor ORAC se obtiene calculando la diferencia de áreas bajo las curvas de descenso de fluorescencia de β -Ficoeritrina a lo largo del tiempo entre el blanco y una muestra. Los resultados finales se expresan usando Equivalentes de Trolox

TABLA 1
Descripción de las características más importantes de los distintos métodos de medida de actividad antioxidante

Características	Ensayos de transferencia de átomos de hidrógeno				Ensayos de transferencia de electrones			Otros ensayos		
	TRAP	ORAC	DCFH-DA	Ensayo Crocina	DPPH	ABTS	FRAP	Voltametría cíclica	Ensayo Luminol	TOSC
<u>Especie iniciadora</u>	AAPH (radicales peroxilo)	AAPH/ H ₂ O ₂ -Cu ²⁺ / CuSO ₄	AAPH (radicales peroxilo)	ABAP (radicales peroxilo)	Radical DPPH*	Ferrilmioglobina/H ₂ O ₂ / K ₂ S ₂ O ₈ → ABTS ²⁺		Potencial eléctrico	AAPH/H ₂ O ₂ / perborato → luminol [?]	ABAP (radicales peroxilo)
<u>Medida</u>	Oxígeno consumido	Inhibición de la caída de fluorescencia de PE/FL	Inhibición de oxidación de DCFH-DA	Inhibición de la oxidación de crocina	Descenso de DPPH [?]	Descenso de ABTS ²⁺	Reducción: TPTZ-Fe ³⁺ a TPTZ-Fe ²⁺	Capacidad reductora	Inhibición de quimioluminiscencia	Inhibición de oxidación de α-ceto-γ-m-butírico
<u>Técnica</u>	Electrodo de oxígeno	Fluorimetría	Espectrofotometría / Fluorimetría	Espectrofotometría	Espectrofotometría	Espectrofotometría	Espectrofotometría	Voltametría cíclica	Quimioluminiscente	Cromatografía de gas
<u>Cuantificación</u>	Longitud de fase de retraso	Fl a λ _{ex} 540 y λ _{em} 565 nm técnica AUC	Abs: 504 nm/ Fl: λ _{ex} 504 λ _{em} 529 nm- Fase de retraso	Abs: 443 nm/ competición cinética	Absorbancia a 515 nm	Absorbancia a 414 nm	Absorbancia a 593 nm y calibrado FeSO ₄ •7H ₂ O	Curva de potencial de corriente	Tiempo que dura la inhibición	AUC y comparación con reacción basal
<u>Expresión de resultados</u>	Equivalentes de Trolox	Equivalentes de Trolox	Equivalentes de Trolox	Equivalentes de Trolox	EC50 muestra que disminuye 50% DPPH*	Equivalentes de Trolox	μmol Fe ²⁺ /L	E _{1/2} : Potencial de oxidación /a: corriente anódica	Equivalentes de Trolox	Relativo a concentración 1 μM de antioxidante
<u>Muestras</u>	Alimentos, muestras biológicas	Fenoles, alimentos, bebidas, muestras biológicas	Muestras biológicas	Muestras biológicas	Fenoles, alimentos, bebidas	Fenoles, alimentos, bebidas, muestras biológicas	Alimentos, bebidas, muestras biológicas	Compuestos puros, muestras biológicas	Fluidos biológicos	Compuestos puros, tejidos
<u>Referencias</u>	31-32	34-38	39	40-41	42-43	44-45	46	47	48-49	50

En conclusión, a la hora de abordar el estudio de la actividad antioxidante del vino es aconsejable emplear varios métodos, ya que cada uno ofrece información diferente. Hay compuestos antioxidantes que no reaccionan con determinadas especies oxidantes y sí con otras, pudiéndose obtener así valores dispares entre los distintos métodos.

Siendo el vino un alimento de sustrato hidroalcohólico, los métodos de medida de actividad antioxidante basados en especies hidrosolubles son de elección. En el caso de métodos *in vitro*, si el objetivo es realizar un screening de actividades antioxidantes de diferentes tipos de vinos, los métodos ABTS y DPPH son buenas elecciones, debido a su facilidad de uso y accesibilidad. El estudio de la actividad *in vivo* derivada de una ingesta de vino requiere el empleo de un método que mimetice las condiciones del organismo, como es el método ORAC, ya que utiliza una diana con significado biológico (proteína) y un tipo de especie oxidante presente en el organismo (radicales peróxido).

Actividad antioxidante del vino

En general, los valores de actividad antioxidante de los vinos tintos obtenidos con diferentes métodos son significativamente superiores a los de los vinos blancos, rosados o generosos (59-60). La magnitud de la diferencia observada entre los vinos tintos y blancos varía en función del método empleado (Tablas 2 y 3). Si se comparan vinos blancos y generosos, de elaboración similar, no existen diferencias significativas entre los valores de actividad antioxidante medidos con los métodos ORAC-PE, ABTS y DPPH (59).

TABLA 2
Valores de actividad antioxidante (AA) de los vinos obtenidos con distintos métodos de medida

Métodos	Tipos de vinos			
	Tintos	Blancos	Generosos	Rosados
TRAP (mM Trolox)	14,22 (61) 29,16 (104)	4,2 (104)	2,09 (61)	2,47 (61) 5,00 (104)
ORAC (μM)	7180 (59) 7800 (63)	1173 (59)	1297 (59)	
ABTS (mM Trolox)	10,84 (61) 14,83 (69) 14,55 (106) 8,73 (60) 5,01 (59) 7,5 (45)	1,81 (61) 0,92 (69) 1,6 (60) 0,46 (59) 1,2 (109)	0,26 (59)	2,04 (61)
DPPH (mM Trolox)	3,95 (105) 11,49 (69) 9,44 (59)	0,48 (105) 0,61 (69) 0,52 (107) 0,83 (59)	0,78 (59)	
FRAP (mM Fe ²⁺)	28,65 (61)	4,20 (61)		6,74 (61)
Crocina (mM Trolox)	17,38 (108)			
Luminol (mM Trolox)	2,18 (108)			

(): Referencias bibliográficas

TABLA 3
Relación encontrada entre la actividad antioxidante (AA) de los vinos tintos y los vinos blancos con distintos métodos de medida

Métodos de medida	AA vino tinto / AA vino blanco
ORAC-PE	6,1 (59) 4,3 (110)
ABTS	11 (59) 7,7 (68) 6,2 (61)
DPPH	11 (59)
TRAP	7,2 (104) 6,8 (61)

(): Referencias bibliográficas

El vino tinto presenta mayor actividad antioxidante (métodos TRAP, FRAP y ABTS) que coñac, grapa, ron, cerveza y whiskey (61). Los valores TRAP y ABTS de vinos blancos fueron inferiores al del whiskey para algunas muestras y similar para otras. Con respecto al método TRAP, que utiliza R-PE y ABAP, la actividad antioxidante del vino tinto (14,22 mM) fue superior que la del vinagre (4,80 mM), té verde (7,63 mM) y té negro (4,87 mM). El vino tinto además presentó mayor valor TRAP que todas las bebidas no alcohólicas, los extractos de frutas y las verduras. En cambio, la actividad antioxidante del vino blanco (2,09 mM) fue menor que la del vinagre y el té (61).

Relación entre la actividad antioxidante del vino y su composición fenólica

Se ha determinado el contenido y la composición fenólica de los vinos mediante distintos procedimientos, con el fin de encontrar posibles relaciones entre los valores de actividad antioxidante obtenidos en las muestras y su perfil fenólico (62-64). La primera aproximación ha consistido en determinar la concentración de fenoles totales de los vinos. El método ampliamente usado para tal efecto ha sido el Índice de Polifenoles Totales (IPT) o Índice de Folin-Ciocalteu. En general, se ha encontrado una correlación lineal elevada entre los valores de actividad antioxidante y el IPT de los vinos (60, 62, 65,66) (Tabla 4).

La técnica de Extracción en Fase Sólida (SPE), que se basa en la diferencia de polaridad de los compuestos, se ha empleado para separar las principales fracciones de compuestos fenólicos de los vinos tintos (67). En concordancia con el proceso de elaboración de los vinos tintos, la fracción correspondiente a flavan-3-oles y antocianos es la más abundante, los ácidos fenólicos les siguen en orden cuantitativo y los flavonoles presentan la concentración más pequeña (59). Varios autores han encontrado correlación lineal elevada entre la concentración de flavan-3-oles y la actividad antioxidante

del vino tinto medida por el método ABTS (68,69), FRAP (70), DPPH (71) y voltametría cíclica (72). Los flavonoles no presentan una relación significativa con la actividad antioxidante de los vinos (59,73). Los ácidos fenólicos presentan una correlación lineal significativa entre su concentración y la actividad antioxidante de los vinos tintos (59,70).

TABLA 4

Coefficientes de correlación lineal obtenidos entre la actividad antioxidante medida con distintos métodos y el IPT de vinos tintos, blancos, generosos o el conjunto de ellos

Métodos	Tintos	Tipos de vinos		
		Blancos	Generosos	Conjunto
ORAC-PE	0,7519 (59)	0,7186 (59)	0,9474 (59)	0,9125 (59)
	0,8456 (110)	0,7377 (110)		
ABTS		0,7219 (59)		0,9012 (59)
				0,9902 (68)
DPPH	0,8237 (59)	0,5547 (59)	0,6755 (59)	0,9769 (59)
	0,7082 (71)			
	0,935 (69)			
DMPD Electroquímica	0,6588 (59)	0,6656 (59)		0,7771 (59)
	0,83 (72)			

(): Referencias bibliográficas

Se ha medido la actividad antioxidante de cada familia de compuestos con el fin de determinar su contribución al valor total de los vinos tintos. La fracción correspondiente a flavan-3-oles y antocianos presentó la actividad antioxidante mayor medida por los métodos ORAC-PE, ABTS, DPPH e inhibición de la oxidación de las LDL y es la que más contribuye a la actividad antioxidante de los vinos tintos (representa de 33,3% a 40,2% del total) (59,63,74). La fracción de los ácidos fenólicos sigue en orden de actividad (de 6,41% a 20,8% del total del vino). La fracción correspondiente a los flavonoles es la que menor contribución presenta. A pesar de que en estudios *in vitro* los flavonoles presenten elevada actividad antioxidante (75), estos compuestos no se presentan en suficientes cantidades en el vino para ser considerados determinantes de su actividad antioxidante (76).

La composición fenólica de los vinos blancos se ha analizado ampliamente mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE). Se ha intentado relacionar la concentración de los compuestos fenólicos con la actividad antioxidante de estos vinos, obteniendo coeficientes de correlación lineal elevados ($r > 0,7000$) en el caso de algunos compuestos (Tabla 5). Sin embargo, la actividad antioxidante de los vinos está más relacionada con el conjunto de fenoles que con algún compuesto de forma singular, a pesar de que ciertos compuestos contribuyan más que otros a la actividad antioxidante del vino (68,70,72,77).

TABLA 5

Coefficientes de correlación lineal ($r > 0,7000$) obtenidos entre la actividad antioxidante medida con distintos métodos y la concentración de compuestos fenólicos en vinos blancos

Compuestos fenólicos	Métodos de medida			Peroxidación lipídica
	ABTS	DPPH	ORAC-PE	
Acido gálico	0,8300 (111)		0,8942 (38)	0,9200 (62)
Acido cutárico	0,7598 (77)		0,7218 (38)	
Cafeato de etilo	0,7765 (38)	0,7566 (38)	0,9309 (38)	
5-Hidroximetil-furfural		0,7295 (38)	0,8938 (38)	

(): Referencias bibliográficas

Nosotros hemos intentado construir ecuaciones que predigan la actividad antioxidante de los vinos a partir de sus constituyentes fenólicos (38). Hemos buscado una combinación lineal a partir de los valores de actividad antioxidante teóricos de los compuestos fenólicos a las concentraciones que se encuentran en los vinos. Con el análisis estadístico de regresión múltiple se obtuvo la siguiente ecuación ($r = 0,9028$):

$$AA_{\text{vino blanco}} = -1270,28 + 0,587 \cdot ORAC_{\text{gálico}} + 0,431 \cdot ORAC_{\text{protocatequico}} - 0,18 \cdot ORAC_{\text{furfural}} + 0,359 \cdot ORAC_{\text{tiroso}} + 0,456 \cdot ORAC_{\text{cafeico}} + 0,324 \cdot ORAC_{\text{galato de epigallocatequina}} - 0,68 \cdot ORAC_{\text{cumárico}}$$

De modo que para poder explicar la actividad antioxidante de un vino hay que acudir a la concentración de un amplio número de compuestos fenólicos.

Evaluación de la capacidad antioxidante del plasma tras la ingesta de vino

La capacidad antioxidante del plasma representa el balance antioxidante del organismo y valora tanto los antioxidantes endógenos como exógenos. Se ha usado como marcador indirecto de la biodisponibilidad de los antioxidantes presentes en los alimentos en estudios de intervención, tanto para evaluar el efecto aislado de un alimento a corto plazo como su influencia mediante su suplementación en la dieta a largo plazo (32).

En concreto se ha estudiado el efecto de la ingesta de espinacas, fresas (78), arándanos (79), chocolate negro (80), café (81), té negro y verde (82,83), proantocinidinas de la uva (84), chocolate rico en procianidinas (85), y bebidas alcohólicas como cerveza (86), vino blanco y vino tinto (78,83,87,88), entre otros.

Idoneidad de los métodos de medida de la capacidad antioxidante del plasma

Actualmente, la determinación de la capacidad antioxidante del plasma tras la ingesta de vino se realiza con métodos diversos (89). No existe consenso científico sobre el más idóneo, pues difieren en el objeto de medida y su posible significación biológica, así como en la interferencia que puedan presentar con los componentes del plasma. Se podría escoger cualquiera de los métodos de medida de actividad antioxidante adaptados para muestras biológicas siempre que el método esté analíticamente validado.

Plasma versus suero

Hay autores que utilizan el plasma en el estudio de la capacidad antioxidante (86), y otros emplean suero sanguíneo (79,90). Algunos trabajos no muestran diferencias significativas entre los valores de capacidad antioxidante de plasma y suero (31), en cambio, otros muestran valores más altos en el plasma que en el suero (38), o al contrario (91). En otro estudio realizado por Ghiselli y colaboradores (32), los valores de capacidad antioxidante del plasma y del suero fueron significativamente distintos en sujetos fumadores, pero no presentaban diferencias significativas en los no fumadores.

El suero se obtiene después de la eliminación del coágulo de fibrina de la sangre a temperatura ambiente. La muestra se somete así a una mayor exposición a la luz, por lo que posiblemente se pierden antioxidantes que son inestables en tales condiciones. Por otra parte, durante la agregación, las plaquetas liberan especies radicalarias que pueden disminuir la capacidad antioxidante de la muestra de suero. Esto hace aconsejable trabajar con muestras de plasma en lugar de suero para evitar pérdidas de compuestos (32). La determinación clínica de compuestos endógenos que influyen potencialmente en la capacidad antioxidante (albúmina, bilirrubina, ácido úrico) se realiza con mayor frecuencia en muestras de plasma.

Incremento medio de la capacidad antioxidante del plasma tras el consumo de vino

Los ensayos con voluntarios humanos muestran un incremento en el valor de la capacidad antioxidante tras el consumo de vino tinto, a pesar de existir diferencias interindividuales. Esta variabilidad en los resultados puede ser debida a diferencias en la absorción de los compuestos fenólicos del vino, relacionadas con la velocidad de absorción y la magnitud de la misma.

Estudios realizados con el método ORAC-PE e igual cantidad de vino tinto ingerida (300 mL), muestran valores de incremento medio máximo de la capacidad antioxidante del plasma similares y se alcanzan en tiempos parecidos: 16,4% a los 55 minutos de la ingesta de vino (38), 16,9% a los 60 minutos (78) o 14,4% a los 50 minutos (87). Las ligeras variaciones encontradas entre los valores pueden atribuirse a que

los grupos presentan distinta edad y sexo en cada estudio. En cambio en el método FRAP, se encuentran porcentajes de incremento más dispares: 28,6% a los 55 minutos de la ingesta de vino (38) o 5,5% a los 60 minutos (78).

En relación con otros alimentos, el vino tinto induce un incremento medio superior en los valores de capacidad antioxidante. Se ha obtenido un aumento máximo del 9% (ORAC-PE) tras el consumo de 294 g de espinacas, del 14% después del consumo de 240 g de fresas (78) y del 15% tras la ingesta de un suplemento de 100 gramos de arándanos en polvo seco (equivale a 500-650 gramos de arándanos enteros) (79). El consumo de 500 mL de cerveza ocasionó un incremento máximo en la capacidad antioxidante del plasma muy similar al analizado para el vino tinto, aunque también hay que considerar que el volumen ingerido fue bastante superior (86).

La capacidad antioxidante del plasma medida con el método FRAP aumentó un 12,2% tras la ingesta de 294 g de espinacas, un 4,8% después del consumo de 240 g de fresas (78), un 3,5% después de ingerir 100 g de chocolate negro (80) y un 4% tras consumir 400 mL de té verde (20 g de hojas de té seco) (83).

Contribución de los compuestos antioxidantes a la capacidad antioxidante del plasma: compuestos fenólicos del vino y antioxidantes endógenos

Los compuestos antioxidantes del plasma relacionados con el consumo de vino son los compuestos fenólicos que se absorben y los metabolitos originados por la flora colónica, que se reabsorben posteriormente. El organismo absorbe un porcentaje mínimo de la concentración inicial de estos compuestos y, por otra parte, una vez que alcanzan el torrente sanguíneo, sufren una dilución considerable. Tras administrar dosis considerablemente elevadas de *trans*-resveratrol (25 mg/70 kg peso), (+)-catequina (25 mg/70 kg peso) y quercetina (10 mg/70 kg peso), los porcentajes de absorción de estos compuestos fueron 16-17%, 1,2-3% y 2,9-7% de las dosis administradas respectivamente (92). Ningún compuesto fenólico excede una concentración de 1 μ M en el plasma tras el consumo de 10-100 mg del mismo (93).

Estos niveles tan bajos en el plasma humano constituyen una dificultad para su identificación y cuantificación, ya que la mayoría están por debajo de los límites de detección de las técnicas cromatográficas actuales. Sin embargo, el incremento observado en la capacidad antioxidante del plasma en los estudios indica que la proporción absorbida de estos compuestos sí es suficiente para desempeñar su papel antioxidante y presentar actividad en el organismo.

Hay autores que ofrecen las concentraciones que resultan efectivas para algunos compuestos: 0,75 μ M para (-)-epigallocatequina, 1,2 μ M para ácido gálico, 0,25-0,38 μ M para (-)-epicatequina, (+)-catequina, (-)-galato de epicatequina y (-)-galato de epigallocatequina, con respecto a la inhibición

de la oxidación de LDL al 50% (94). La ingesta diaria de 375 mL de vino tinto durante 2 semanas produjo un aumento significativo de la capacidad antioxidante del plasma medida con el método TBARS y en la concentración plasmática de compuestos fenólicos y sus metabolitos glucuronidado y metilados (95).

Por otra parte, los compuestos antioxidantes endógenos (albúmina, bilirrubina, ácido úrico, glutatión) podrían influir en la capacidad antioxidante del plasma, si modifican su concentración tras el consumo de vino (84,96).

Los métodos ORAC-PE, FRAP, TRAP, ABTS y DPPH miden la capacidad antioxidante del compartimento hidrofílico o acuoso del plasma donde se localizan los compuestos antioxidantes solubles en agua (ácido ascórbico, ácido úrico y proteínas). La actividad antioxidante de los compuestos liposolubles que se encuentran en las lipoproteínas del plasma, tales como carotenoides y tocoferoles, no influyen en las medidas realizadas con estos métodos, y han de estimarse mediante otros ensayos.

Se ha estudiado el porcentaje de contribución de los distintos compuestos endógenos a la capacidad antioxidante total del plasma determinada por los métodos de uso más frecuente en la bibliografía (97). Así, el ácido úrico (60,0% y 57,8% de contribución para FRAP y TRAP respectivamente) y la albúmina (27,8% y 28,0% de contribución para ORAC-PE y ABTS respectivamente), son los compuestos que más contribuyen a la capacidad antioxidante del plasma (Tabla 6).

TABLA 6
Porcentajes de contribución de los compuestos antioxidantes endógenos a la capacidad antioxidante del plasma medida por los métodos ORAC-PE, FRAP, ABTS y TRAP

% Contribución	-SH (albúmina)	Acido úrico	Acido ascórbico	Carotenoi- des Tocoferoles
ORAC-PE	27,8	7,1	1,3	0,7
FRAP	10,0	60,0	15,0	5,0
ABTS	28,0	19,3	3,1	1,7
TRAP	24,2	57,8	8,9	9,1

En otro trabajo (46), se estudió la contribución de ácido úrico, bilirrubina y albúmina a la capacidad antioxidante del plasma (FRAP), obteniendo valores de contribución del 60,5% y 10% respectivamente. La contribución de albúmina y bilirrubina es escasa y despreciable y no ha de ser tomada en cuenta en las medidas realizadas con este ensayo. Además, a nivel basal existe una relación lineal significativa entre la capacidad antioxidante del plasma (FRAP) y la concentración de ácido úrico ($r = 0,81889$) (38) y entre los valores ORAC-PE del plasma y las concentraciones de albúmina ($r = 0,81509$).

Por otra parte, Ghiselli et al. (32) estimaron que las proteí-

nas contribuyen en un 86% a la capacidad antioxidante del plasma (ORAC-PE). Los grupos -SH de la proteína albúmina son responsables de parte de esta capacidad antioxidante porque reaccionan con radicales peroxilo durante los primeros pasos de la reacción de oxidación, y contribuyen a la duración de la fase de retraso.

En un estudio realizado con 51 sujetos maduros pertenecientes al grupo "Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention", el análisis de regresión múltiple puso de manifiesto una correlación lineal significativa entre la capacidad antioxidante estudiada mediante el método TRAP y las concentraciones de urato y ácido ascórbico. El urato fue la contribución más alta del TRAP medido en el plasma (98). Se señaló la existencia de un porcentaje de contribución al valor TRAP no identificado, que según Metsä-Ketelä (48) podría deberse a la albúmina.

El consumo de 375 mL de vino tinto provocó un aumento significativo de la concentración de urato en suero (83). De la misma forma se observó un aumento significativo en los niveles de urato del plasma después del consumo de una dieta rica en grasas acompañada de 400 mL de vino tinto, y un aumento no significativo en los niveles de grupos -SH y α -tocoferol. La ingesta de 200 mL de café (60 gramos de café tostado y molido por litro de agua) produjo un incremento estadísticamente significativo de ácido úrico en el plasma. En cambio, otros compuestos como ácido ascórbico o γ -tocoferol no se modificaron, y los grupos -SH tampoco mostraron un incremento significativo (81). La ingesta de una comida rica en grasas acompañada de 300 mg de un extracto de proantocianidinas del grano de la uva provocó también un aumento significativo de grupos -SH y urato (84).

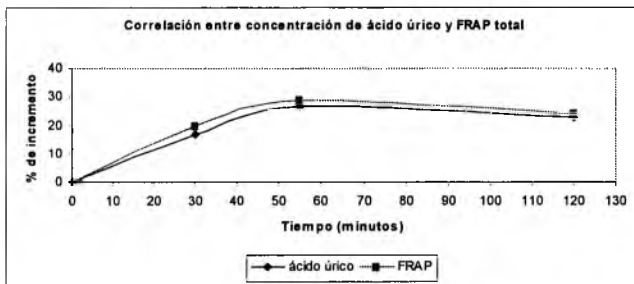
En otros trabajos se describe, por el contrario, cómo los antioxidantes endógenos no se modifican tras la ingesta de alimentos. Los niveles plasmáticos de ácido úrico no sufren cambios significativos después del consumo de té negro y verde (82), 500 mL de cerveza (86) u 80 gramos de chocolate rico en procianidinas (557 mg) (85). Tampoco se observaron cambios en los niveles de bilirrubina tras el consumo de fresas, espinacas o vino tinto (78).

En nuestros estudios, tras el consumo de 300 mL de vino tinto, se obtuvo una correlación lineal positiva muy elevada entre los valores de capacidad antioxidante medidos con el método FRAP y las concentraciones de ácido úrico. En la Figura 2 se observa que el incremento medio del valor FRAP y el incremento de la concentración de ácido úrico siguen una evolución similar (38).

La contribución del ácido úrico al valor FRAP implica que su concentración debe ser determinada y tomada en cuenta cuando se estudian los efectos del consumo de alimentos en la capacidad antioxidante del plasma medida mediante este ensayo. Si se considera que el 60% del valor FRAP del plasma se debe a la actividad antioxidante del ácido úrico, como

apuntan algunos autores (46,97), se podría considerar que el 40% del valor FRAP restante se debe a los compuestos fenólicos del vino y sus metabolitos.

FIGURA 2
Cambios medios (%) en el valor FRAP y la concentración de ácido úrico después del consumo de 300 mL de vino tinto



El efecto del vino sobre este aumento del ácido úrico puede deberse a la acción del alcohol o de los compuestos fenólicos que contiene. El efecto del consumo de alcohol en la concentración de ácido úrico sérico ha sido objeto de discusión recientemente debido a que el mecanismo implicado en tal efecto no se conoce totalmente (99). El etanol induce un aumento en la concentración plasmática de uridina y purinas. La uridina es atribuible a un incremento en la degradación de bases de pirimidina y purina (100). En otros estudios, la relación entre el etanol y la concentración de ácido úrico no es tan evidente. La administración oral de etanol en sujetos sanos no incrementó la actividad de la enzima xantina oxidasa, responsable de la ruta catabólica de síntesis del ácido úrico (101). La administración intravenosa de etanol (0,25-0,35 g/kg/h) durante dos horas, no produjo cambios significativos en los niveles de urato en suero, ni tampoco en la excreción urinaria del ácido úrico (102). Una ingesta de 0,5 g etanol/kg incrementa la concentración de ácido úrico alrededor de 6,7 mg/L en bebedores habituales (>60 g etanol/día), pero no en bebedores ocasionales o no bebedores. Además, los niveles de hipoxantina y xantina en plasma incrementaron sus niveles en mayor medida en el grupo de los bebedores habituales. Parece que en estos últimos ocurre una degradación acelerada de adenina provocada por el aumento en la oxidación del etanol (103).

Por otra parte, el consumo de vino tinto produjo un aumento significativo en el nivel de ácido úrico plasmático (5,6%), sin embargo, la ingesta del mismo vino previamente dealcoholizado no produjo este incremento (83). Parece ser que el metabolismo de la molécula de etanol en el hepatocito produce un incremento en la degradación de ATP hacia los precursores de ácido úrico (nucleótido de adenina) y, por consiguiente, un aumento en la formación de ácido úrico a partir de la degradación de los nucleótidos de las purinas (83).

Además del efecto del alcohol, se ha estudiado la influencia de los polifenoles en los niveles de ácido úrico. Extractos de manzana, que contienen polifenoles de esta fruta, retrasan significativamente la oxidación *in vitro* del urato del plasma mediada por radicales peroxilo; el mecanismo propuesto para la inhibición de dicha oxidación puede ser la reducción de la especie radical de urato por ciertos polifenoles, como quercetina o (+)-catequina, regenerando, por consiguiente, urato en el plasma. Esta reacción es termodinámicamente posible (96). Por otra parte, parece que los compuestos fenólicos son capaces de interaccionar con los mecanismos de secreción y reabsorción del ácido úrico aumentando el nivel de éste en el plasma (88).

A pesar de la influencia manifiesta de los compuestos antioxidantes endógenos, la capacidad antioxidante del plasma tras el consumo de vino no puede ser simplemente debida a éstos y, en particular, al ácido úrico. El ácido úrico no afecta los valores ORAC, y además su actividad es muy baja (ORAC-FL) (1,38 μ M) dando una contribución despreciable a los valores ORAC-FL del plasma. Por tanto otras moléculas, los compuestos fenólicos, además del ácido úrico son responsables del incremento observado en la capacidad antioxidante después del consumo de vino (38). Dietas que contienen alimentos con cantidades significativas de polifenoles influyen en el incremento de la capacidad antioxidante del plasma, además del efecto de los antioxidantes endógenos. En un trabajo realizado con 8 hombres sanos y jóvenes, que ingirieron una comida rica en grasas acompañada de 300 mg de extracto de proantocianidinas del grano de la uva, se constató un aumento significativo de la capacidad antioxidante del plasma medido por TRAP. El valor TRAP teórico, que se calculó a partir de las concentraciones de los antioxidantes anteriores fue menor que el valor TRAP medido en el plasma. Por ello, otros antioxidantes contribuyeron en la capacidad antioxidante del plasma después del suplemento de proantocianidinas. Cuando los sujetos consumieron la comida rica en grasas sin extracto de uva, el valor TRAP teórico coincidió con el valor TRAP medido (84).

Se podría concluir así que el vino interviene en la capacidad antioxidante del plasma pudiendo actuar de forma directa (per se), por su contenido en compuestos fenólicos, e indirecta, ya que puede inducir un aumento en los niveles plasmáticos de otros antioxidantes endógenos.

REFERENCIAS

1. Halliwell B, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. Arch. Biochem. Biophys. 1990; 280: 1-8.
2. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. Am. J. Med. 1991; 91: 31S-39S.
3. Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Free Radic. Res. 1996; 25: 57-74.

4. Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 1996; 20: 707-727.
5. Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, Joshi SS, Pruess HG. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 2000; 148: 187-197.
6. Diplock AT, Charleux JL, Crozier-willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Viña-Ribes J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br J Nutr.* 1998; 80 (1): S77-S112.
7. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* 1997; 324: 1-18.
8. Taylor A. Cataract: relationship between nutrition and oxidation. *J Am Coll Nutr.* 1993; 12: 138-146.
9. Gerster H. β -Carotene, vitamin E and vitamin C in different stages of experimental carcinogenesis. *Eur J Clin Nutr.* 1995; 49: 155-168.
10. Park YK, Park E, Kim JS, Kang MH. Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. *Mutat Res.* 2003; 529: 77-86.
11. Le Core L, Fustier P, Chalabi N, Bignon YJ, Bernard-Gallon D. Effects of resveratrol on the expression of a panel of genes interacting with the BRCA1 oncosuppressor in human breast cell lines. *Clin Chim Acta* 2004; 344: 115-121.
12. Jampol LM, Ferris FL. Antioxidants and zinc to prevent progression of age-related macular degeneration. *J. Am. Med. Assoc.* 2001; 286 (19): 2466-2468.
13. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 1998; 56 (11): 317-333.
14. Pannala AS, Chan TS, O'Brien P, Rice-Evans C. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast-reaction kinetics. *Biochem Biophys Res Com.* 2001; 282: 1161-1168.
15. Rice-Evans C, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med.* 1996; 20: 933-956.
16. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol Med.* 1997; 22: 749-760.
17. Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Hoult JRS, Halliwell B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclooxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives: relationship to antioxidant activity and to iron reducing ability. *Biochem Pharmacol.* 1991; 42: 1673-1681.
18. Andriambelosen E, Magnier C, Haan-Archipoff G, Lobstein A, Anton R, Beretz A, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *J Nutr.* 1998; 128: 2324-2333.
19. Cook NC, Samman S. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Nutr Biochem.* 1996; 7: 66-76.
20. Delmas D, Rebe C, Lacour S, Filomenko R, Athias A, Gambert P, Cherkaoui-Malki M, Jannin B, Dubrez-Daloz L, Latruffe N, Solary E. Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death inducing signaling complex in colon cancer cells. *J Biol Chem.* 2003; 278: 41482-41490.
21. Stewart JR, Artime MC, O'Brian CA. Resveratrol: A candidate nutritional substance for prostate cancer prevention. *J Nutr.* 2003; 133: 2440S-2443S.
22. Renaud S, De Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992; 339: 1523-6.
23. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, KatAN MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993; 342: 1007-1011.
24. Hein HO, Suadicani P, Gyntelberg F. Alcohol consumption, serum low density lipoprotein cholesterol concentration, and risk of ischaemic heart disease: six year follow up in the Copenhagen male study. *Br Med J.* 1996; 312: 736-741.
25. McElduff P, Dobson AJ. How much alcohol and how often? Population based case-control study of alcohol consumption and risk of a major coronary event. *Br Med J.* 1997; 314: 1159-1167.
26. Frankel N, Meyer AS. Review The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J Sci Food Agric.* 2000; 80: 1925-1941.
27. Wang CC, Chu CY, Chu KO, Choy KW, Khaw KS, Rogers MS, Pang CP. Trolox-Equivalent Antioxidant capacity Assay Versus Oxygen radical Absorbance Capacity Assay in plasma. *Clin Chem.* 2004; 50 (5): 952-954.
28. Pérez DD, Leighton F, Aspee A, Aliaga C, Lissi E. A comparison of methods employed to evaluate antioxidant capabilities. *Biol. Res.* 2000; 33 (2): 71-77.
29. Schwarz K, Bertelsen G, Nissen LR, Gardner PT, Heinonen MI, Hopia A, Huynh-BA T, Lambelet P, Mcpail D, Skibsted LH, Tijburg. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *Eur Food Res Technol.* 2001; 212 (3): 319-328.
30. Arnao MB, Cano A, Acosta M. Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free Rad Res.* 1999; 31: S89-96.
31. Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Locke S. Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation: The important contribution made by plasma proteins. *FEBS Lett.* 1985; 187 (1): 33-37.
32. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity is a tool to asses redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med.* 2000; 29 (11): 1106-1114.
33. Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 2002 ; 127: 183-198.
34. Cao G, Prior RL. Measurent of Oxygen Radical Absorbance Capacity in biological samples. *Meth Enzymol.* 1999; 299 (5): 50-62.
35. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem.* 2001; 49: 4619-4626.

36. Davalos A, Bartolome B, Suberviola J, Gomez-Cordoves C. Orac-fluorescein as a model for evaluating antioxidant activity of wines. *Pol J Food Nutr Sci.* 2003; 12 (SI 1): 133-136.
37. Davalos A, Gomez-Cordoves C, Bartolome B. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *J Agric Food Chem.* 2004; 52 (1): 48-54.
38. Fernández-Pachón MS, Villaño D, Troncoso AM, García-Parrilla MC. Antioxidant Capacity of Plasma after red wine intake in human volunteers. *J Agric Food Chem.* 2005; 53 (12): 5024-5029.
39. Valkonen M, Kuusi T. Spectrophotometric assay for total peroxy radical-trapping antioxidant potential in human serum. *J Lipid Res.* 1997; 38: 823-833.
40. Tubaro F, Ghiselli A, Papuzzi P, Maiorino M, Ursini F. Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. *Free Radic Biol Med.* 1998; 24: 1228-1234.
41. Lussignoli S, Fraccaroli M, Andrioli G, Brocco G, Bellavite P. A microplate-based colorimetric assay of the total peroxy radical trapping capability of human plasma. *Anal Biochem.* 1999; 269: 38-44.
42. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol.* 1995; 28: 25-30.
43. Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric.* 1998; 76: 270-276.
44. Cano A, Hernández-Ruiz J, García-Cánovas F, Acosta M, Arnao MB. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochem Anal.* 1998; 9: 196-202.
45. Alonso AM, Domínguez C, Guillén DA, Barroso CG. Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. *J Agric Food Chem.* 2002; 50: 3112-3115.
46. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Anal Biochem.* 1996; 239: 70-76.
47. Kohen R, Beit-Yannai E, Berry EM, Tirosh O. Overall low molecular weight antioxidant activity of biological fluids and tissues by cyclic voltammetry. *Meth Enzymol.* 1999; 300: 285-296.
48. Metsä-Ketelä T. Luminescent assay for total peroxy radical-trapping capability of plasma. *Biolumin. Chemilumin. Proc Int Symp. 6th Meeting 1991*; 389-392.
49. Alho H, Leinonen J. Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods. *Meth Enzymol.* 1999; 299: 3-14.
50. Winston GW, Regoli F, Dugas AJ, Fong JH, Blanchard KA. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radic Biol Med.* 1998; 24: 480-493.
51. Morel I, Lescoat G, Cogrel P, Sergent O, Pasdeloup N, Brissot P, Cillard P, Cillard J. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem Pharmacol.* 1993; 45 (1): 13-19.
52. Frankel EN. In search for the better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends Food Sci Technol.* 1993; 4: 220-225.
53. Villaño D, Fernández-Pachón MS, Troncoso AM, García-Parrilla MC. The antioxidant activity of wines determined by the ABTS method: influence of sample dilution and time. *Talanta* 2004; 64: 501-509.
54. Girotti S, Ferri E, Maccagnani L, Budini R, Bianchi G. Plasma antioxidant capacity determination: comparative evaluation of chemiluminescent and spectrophotometric assays. *Talanta* 2002; 56: 407-414.
55. Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of Plasma and Other Biological and Food Samples. *J Agric Food Chem.* 2003; 51: 3273-3279.
56. Aldini G, Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI. A method to measure the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31 (9): 1043-1050.
57. Alcolea JF, Cano A, Acosta M, Arnao MB. Hydrophilic and lipophilic antioxidant activities of grapes. *Nahrung* 2002; 46: 353-356.
58. Gorinstein S, Martin-Belloso O, Katrich E, Lojek A, Ciz M, Gligelmo-Miguel N, Haruenkit R, Park YS, Jung ST, Trakhtenberg S. Comparison of the contents of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging tests. *J Nutr Biochem.* 2003; 14: 154-159.
59. Fernández-Pachón MS, Villaño D, García-Parrilla MC, Troncoso AM. Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Anal Chim Acta* 2004; 513: 113-118.
60. Fogliano V, Verde V, Randazzo G, Ritieni A. Method for measuring antioxidant activity and Its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J Agric Food Chem.* 1999; 47: 1035-1040.
61. Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different In Vitro assays. *J Nutr.* 2003; 133: 2812-2819.
62. Frankel EN, Waterhouse AL, Teissedre PL. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human Low-Density Lipoproteins. *J Agric Food Chem.* 1995; 43: 890-894.
63. Ghiselli A, Nardini M, Baldi A, Scaccini C. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *J Agric Food Chem.* 1998; 46 (2): 361-367.
64. Cao G, Prior RL. Red wine in moderation: potential health benefits independent of alcohol. *Nutr Clin Care* 2000; 3: 76-82.
65. Vinson JA, Hontz BA. Phenol Antioxidant Index: Comparative antioxidant effectiveness of red and white Wines. *J Agric Food Chem.* 1995; 43: 401-403.
66. Sánchez-Moreno C, Jiménez-Escrig A, Saura-Calixto F. LDL oxidizability indexes in measurement of antioxidant activity in selected Spanish wines. *Nutr Res.* 2002; 22: 507-517.

67. Brennehan CA, Ebeler SE. Chromatographic separations using solid-phase extraction cartridges: Separation of wine phenolics. *J Chem Educ.* 1999; 76 (12): 1710-1711.
68. Simonetti P, Pietta P, Testolin G. Polyphenol content and total antioxidant potential of selected Italian wines. *J Agric Food Chem.* 1997; 45: 1152-1155.
69. De Beer D, Joubert E, Gelderblom WCA, Manley M. Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: Free Radical Scavenging. *J Agric Food Chem.* 2003; 51: 902-909.
70. Arnous A, Makris DP, Kefalas P. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant Characteristics of Aged Red Wines. *J Agric Food Chem.* 2001; 49: 5736-5742.
71. Arnous A, Makris DP, Kefalas P. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *J Food Composition Anal.* 2002; 15: 655-665.
72. Brenna OV, Pagliarini E. Multivariate analysis of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. *J Agric Food Chem.* 2001; 49: 4841-4844.
73. Burns J, Gardner PT, O'neil J, Crawford S, Morecroft I, Mcphail DB, Lister C, Matthews D, Maclean MR, Lean MEJ, Duthie GC, Crozier A. Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. *J Agric Food Chem.* 2000; 48: 220-230.
74. Kerry NL, Abbey M. Red wine and fractionated phenolic compound prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis* 1997; 135: 93-102.
75. Maxwell SRJ. Wine antioxidants and their impact on antioxidant function in vivo. *ACS Symposium Series* 1997; 661: 150-165.
76. Gardner PT, Mcphail DB, Crozier A, Duthie GG. Electron spin resonance (ESR) spectroscopic assesment of the contribution of quercetin and other flavonols to the antioxidant capacity of red wines. *J Sci. Food Agric.* 1999; 79: 1011-1014.
77. Alonso AM, Guillén DA, Barroso CG, Puertas B, García A. Determination of antioxidant activity of wine byproducts and Its correlation with polyphenolic content. *J Agric Food Chem.* 2002; 50: 5832-5836.
78. Cao G, Russell RM, Lischner N, Prior RL. Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *J Nutr.* 1998; 128: 2383-2390.
79. Kay CD, Holub BJ. The effect of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption on postprandial serum antioxidant status in human subjects. *Br J Nutr.* 2002; 88: 389-397.
80. Serafini M, Bugianesi R, Maiani G, Valtuena S, DE Santis S, Crozier A. Plasma antioxidants from chocolate. *Nature* 2003; 424 (6952): 1013.
81. Natella F, Nardini M, Giannetti I, Dattilo C, Scaccini C. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *J Agric Food Chem.* 2002; 50: 6211-6216.
82. Leenen R, Roodenburg AJ, Tijburg LB, Wiseman SA. A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans. *Eur J Clin Nutr.* 2000; 54: 87-92.
83. Caccetta RAA, Burke V, Mori TA, Beilin LJ, Puddey IB, Croft KD. Red wine polyphenols, in the absence of alcohol, reduce lipid peroxidative stress in smoking subjects. *Free Radic Biol Med.* 2001; 30 (6): 636-642.
84. Natella F, Belelli F, Gentili V, Ursini F, Scaccini C. Grape seed proanthocyanidins prevent plasma postprandial oxidative stress in humans. *J Agric Food Chem.* 2002; 50: 7720-7725.
85. Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG. Epicatechin in human plasma: In vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J Nutr.* 2000; 130: 2109S-2114S.
86. Ghiselli A, Natella F, Guidi A, Montanari L, Fantozzi P, Scaccini C. Beer increases plasma antioxidant capacity in humans. *J Nutr Biochem.* 2000; 11: 76-80.
87. Serafini M, Maiani G, Ferro-Luzi A. Alcohol-free wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J Nutr.* 1998; 128: 1003-1007.
88. Natella F, Ghiselli A, Guidi A, Ursini F, Scaccini C. Red wine mitigates the postprandial increase of LDL susceptibility to oxidation. *Free Radic. Biol Med.* 2001; 30 (9): 1036-1044.
89. Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic. Biol Med.* 1999; 27 (11-12): 1173-1181.
90. Day AP, Kemp HJ, Bolton C, Hartog M, Stansbie D. Effect of concentrated red grape juice consumption on serum antioxidant capacity and low-density lipoprotein oxidation. *Ann Nutr Metab.* 1997; 41: 353-357.
91. Rea CA, Maxwell SR, Maslin DJ, Thomason HL, Thorpe GH. Anticoagulant effects of antioxidant capacity [letter; comment]. *Ann Clin Biochem.* 1996; 33 (Pt 2): 174.
92. Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin Biochem.* 2003; 36: 79-87.
93. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr.* 2000; 130: 2073S-2085S.
94. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 1997; 2: 152-159.
95. Tsang C, Higgins S, Duthie GG, Duthie SJ, Howie M, Mullen W, Lean MEJ, Crozier A. The influence of moderate red wine consumption on antioxidant status and indices of oxidative stress associated with CHD in healthy volunteers. *Brit J Nutr.* 2005; 93: 233-240.
96. Lotito SB, Frei B. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting in vitro and in vivo effects. *Free Radic. Biol Med.* 2004; 36 (2): 201-204.
97. Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI, Aldini G. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Arch Biochem Biophys.* 2004; 430: 97-103.
98. Nyyssönen K, Porkkala-Sarataho E, Kaikkonen J, Salonen JT. Ascorbate and urate are the strongest determinants of plasma antioxidant capacity and serum lipid resistance to oxidation in Finnish men. *Atherosclerosis* 1997; 130: 223-233.
99. Iberopoulos EN, Miltiados GA, Elisaf MS. Alcohol intake, serum uric acid concentrations, and risk of gout. *Lancet* 2004; 364: 246-247.
100. Yamamoto T, Moriwaki Y, Takahashi S, Yamakita J, Tsutsumi Z, Ohata H, Hiroishi K, Nakano T, Higashino K. Effect of ethanol and fructose on plasma uridine and purine bases. *Metabolism* 1997; 46 (5): 544-547.
101. Yamamoto T, Moriwaki Y, Takahashi S, Tsutsumi Z, Yamakita J, Nasako Y, Hiroishi K, Higashino K. Determination of human

- plasma xanthine oxidase activity by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr. B* 1996; 681 (2): 395-400.
102. Faller J, Fox IH. Ethanol-induced hyperuricemia. Evidence for increased urate production by activation of adenine nucleotide turnover. *N Engl J Med.* 1982; 307 (26): 1598-1602.
 103. Nishimura T, Shimizu T, Mineo I, Kawachi M, Ono A, Nakajima H, Kuwajima M, Kono N, Matsuzawa Y. Influence of daily drinking habits on ethanol-induced hyperuricemia. *Metabolism* 1994; 43 (6): 745-748.
 104. Campos AM, Lissi EA. Total antioxidant potential of Chilean wines. *Nutrition Research* 1999; 16 (3): 385-389.
 105. Piljac J, Martinez S, Valek L, Stipcevic T, Ganic KK. A comparison of methods used to define the phenolic content and antioxidant activity of croatian wines. *Food Technology and Biotechnology* 2005; 43 (3): 271-276.
 106. Pellegrini N, Simonetti P, Gardana C, Brenna O, Brighenti F, Pietta P. Polyphenol content and total antioxidant activity of vini novelli (Young Red Wines). *J Agric Food Chem.* 2000; 48 (3): 732-735.
 107. Psarra E, Makris DP, Kallithraka S, Kefalas P. Evaluation of the antiradical and reducing properties of selected Greek white wines: correlation with polyphenolic composition. *J Sci Food Agric.* 2002; 82: 1014-1020.
 108. Girotti S, Bolelli L, Budini R, Arfelli G. Comparison of analytical methods in determining total antioxidant capacity in red wine. *Analytical Letters* 2002; 35 (4): 747-758.
 109. Höner K, Cervellati R, Neddens C. Measurements of the in vitro antioxidant activity of German white wines using a novel method. *Eur Food Res Technol.* 2002; 214: 356-360.
 110. Sánchez-Moreno C, Cao G, Ou B, Prior RL. Anthocyanin and proanthocyanidin content in selected white and red wines. Oxygen Radical Absorbance Capacity comparison with nontraditional wines obtained from Highbush Blueberry. *J Agric Food Chem.* 2003; 51: 4889-4896.
 111. Landrault N, Poucheret P, Ravel P, Gasc F, Cros G, Teissedre PL. Antioxidant capacities and phenolic levels of french wines from different varieties and vintages. *J Agric Food Chem.* 2001; 49: 3341-3348.

Recibido: 17-01-2006

Aceptado: 27-04-2006