



# **DETERMINACIÓN VOLTAMPEROMÉTRICA DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN VINOS**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**Curso: 2018/19**

**Alumno: ESTER PASTOR SÁNCHEZ**

**Tutor: DANIEL SANCHO RINCON**

**Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos**  
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)  
Universidad de Valladolid

## RESUMEN

---

El incremento en el consumo del vino a nivel mundial ha dado lugar a que en los últimos años haya un interés creciente por mejorar su calidad. La decisión de incorporar antioxidantes en los vinos va a influir en gran medida en su composición final. El ácido ascórbico es un antioxidante natural que se encuentra en gran cantidad de productos. En el vino lleva a cabo una acción antioxidante eficaz, y su determinación se ha convertido en objeto de interés para las etapas de producción y control de calidad de las bebidas y alimentos. En esta revisión bibliográfica se presenta una descripción general de la importancia y mecanismo de acción del ácido ascórbico, así como las técnicas analíticas para su cuantificación en distintas bebidas. Se investiga el desarrollo de nuevos métodos voltamperométricos para su determinación en el vino, los cuáles recientemente se han convertido en una alternativa eficaz debido a que son métodos rápidos, simples y económicos.

**PALABRAS CLAVE:** vino, ácido ascórbico, técnicas analíticas, antioxidante, determinación voltamperométrica, bebidas.

## ABSTRACT

Increased wine consumption worldwide has resulted in a growing interest in improving its quality over the last few years. The decision to add antioxidants to wine is going to affect largely on its final composition. Ascorbic acid is a natural antioxidant present in a vast range of products. Regarding wine, it (ascorbic acid) carries out an efficient antioxidant action, and its determination has become an object of interest at the stages of production and quality control of food and beverages. This review presents a general overview of the mechanism of action and importance of ascorbic acid, as well as analytical techniques used for its quantification in a variety of beverages. In addition, this paper follows up the development of emerging voltammetric methods for its determination in wine, which have recently become an effective alternative due to the fact that they are fast, simple and affordable methods.

**KEY WORDS:** wine, ascorbic acid, analytical techniques, antioxidant, voltammetry determination, beverages.

## **INDICE**

---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	4
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	9
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	10
1. <b>Técnicas analíticas para la determinación del ácido ascórbico.</b> ....	10
2. <b>¿Qué es la voltamperometría?</b> .....	11
3. <b>Determinación del ácido ascórbico en bebidas</b> .....	13
4. <b>Método oficial para la determinación del ácido ascórbico en el vino.</b> .....	16
5. <b>Determinación voltamperométrica del ácido ascórbico en el vino.</b> .....	17
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	19
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	20
<b>ANEXO I</b> .....	30

## 1. INTRODUCCIÓN

---

La cultura del vino tiene un papel fundamental en la industria alimentaria española. Casi el 15% del total de la superficie mundial de viñedo se encuentra en España (Gómez-Limón Rodríguez, 2006). Este mercado se ha globalizado dando lugar a un nuevo mapa geográfico, en el que el número de consumidores aumenta a un ritmo constante (Lai, 2018).

El vino se define como un “alimento natural obtenido exclusivamente por fermentación alcohólica, total o parcial, de uva fresca, estrujada o no, o de mosto de uva” (España, 2003). Se considera un producto complejo (incluye cultura, historia, es un elemento de socialización...,) y factores como el país de origen, la edad, el género del consumidor entre otros, van a influir a la hora de elegir un vino u otro (Lai, 2018).

Desde hace un tiempo, el consumidor demanda a la industria alimentaria productos con un alto valor nutricional y microbiológicamente seguros, es por ello que para los vinicultores la calidad se ha convertido en un parámetro imprescindible a la hora de producir sus vinos. Hay que tener en cuenta dos aspectos que influyen en la conservación del vino, por un lado su estabilidad microbiológica, evitando el desarrollo de levaduras y de bacterias contaminantes y por otro su estabilidad oxidativa manteniendo sus características de color, sabor y aroma (Izquierdo Cañas, 2016). En el caso del vino blanco, es un problema grave ya que la degradación oxidativa provoca la pérdida de los aromas característicos de los vinos jóvenes, y de sus notas florales y afrutadas (Danilewicz, 2016).

El ácido ascórbico también conocido como vitamina C es un compuesto natural y soluble en agua (Pisoschi, 2013b), fue originalmente llamado "ácido hexaurónico", debido en parte a su fórmula empírica y a su capacidad conocida para formar sales de sodio y potasio (Bradshaw, Barril, Clark, Prenzler, & Scollary, 2011). Es monobásico y posee un anillo lactona entre los carbonos 1 y 4. Dada la asimetría en C4 y C5, existen cuatro estereoisómeros: los ácidos D- y L-ascórbico, D-isoascórbico (ácido eritórbico) y D-eritro-3-ceto-hexurónico (Zoecklein, Fugelsang, Gump, & Nury, 2001). Su masa molecular es de 176.1 g / mol y tiene un punto de fusión de 193 °C. Es fácilmente soluble en agua (33 g / 100 ml a 25 ° C) sin embargo, es menos soluble en etanol absoluto (2 g / 100 ml), y en etanol al 95% (v/v) (3,3 g / 100 ml) (Ball, 1998).

Se puede encontrar en muchos sistemas biológicos, alimentos (verduras frescas frutas, cítricos) (Loeffler & Ponting, 1998) y su concentración varía desde 500 mg/Kg en las naranjas hasta más de 3.000 mg/Kg en las guayabas (Zoecklein et al., 2001). Lleva

a cabo un papel importante en la biosíntesis del colágeno, la activación de la respuesta inmune, la absorción de hierro y participa en la curación de heridas y la osteogénesis. Además actúa como un poderoso antioxidante que combate las enfermedades inducidas por radicales libres (Danet, Pisoschi, & Kalinowski, 2009).

En el caso de las uvas su contenido es bajo, con cantidades iniciales que rondan entre los 50-100 mg/L (Zoecklein et al., 2001) y entre 10 y 100 mg/L después del estrujado y el prensado consumiéndose casi en su totalidad (Amerine & Ough, 1974; Rankine, 2002). No sólo está presente de forma natural sino que se puede agregar en los productos alimenticios para ejercer una serie de funciones. En el caso de las bebidas refrescantes se suele añadir para enriquecer el contenido de vitamina C presente en estas y así poder establecer una cantidad singular (EE.UU. Patent N.º 4,152,116, 1979). Asimismo, se usa para alargar la vida de muchos productos comerciales (Vázquez, Tascón, & Deban, 2012).

En el vino este compuesto puede estar presente de forma natural o bien puede añadirse por diferentes razones. Aproximadamente en el mosto se encuentra en cantidades de entre 1-18 mg/L, y en los vinos el nivel normal ronda los 2 mg/L (Barceló, 1990). La mayoría desaparece en el proceso de fermentación al ser consumido por las levaduras y bacterias presentes en dicho proceso (Casassa, 2009). Otra razón por la que puede estar presente este ácido, es porque se añade con el fin de enriquecer nutricionalmente el vino agregándole más vitamina C. Asimismo, se puede añadir con el fin de que el vino alcance una acidez óptima. Esta y sobretodo el pH, desempeña una función muy importante en muchos aspectos de su elaboración y de su estabilidad. En ciertas situaciones, las condiciones en las que maduran y se desarrollan las uvas o los cambios físicos y microbianos durante la elaboración del vino, pueden dar lugar a desequilibrios siendo necesarias correcciones en la acidez (Boulton, Singleton, Bisson, & Kunkee, 2002). Normalmente se añade el ácido tartárico, aunque también se puede utilizar el ácido ascórbico cuya acidez se debe a la funcionalidad enediol de su estructura (Bradshaw et al., 2011).

A pesar de ejercer también, las funciones citadas anteriormente, en el vino este ácido se añade para que ejerza una acción antioxidante eficaz e inmediata (Palacios, Carrillo, Borinaga, Rodríguez, & Zaldivar, 2016), al reducir drásticamente el oxígeno disuelto (Izquierdo Cañas, 2016). Permitiendo la estabilización del aroma y el color en estos (Vázquez et al., 2012).

Tradicionalmente ha sido el dióxido de azufre (sulfito) el que ejercía esta función en el vino. Se cree que ya era utilizado por los romanos aunque las primeras referencias

de su uso se remontan al siglo XV (Clarke & Bakker, 2010). A la vez que ejerce de antioxidante, lleva a cabo múltiples funciones: un poder necrosante que favorece la extracción de fenoles y materias colorantes del hollejo de la uva, reacciona con ciertos compuestos del vino otorgándole las propiedades sensoriales y alterando las reacciones de polimerización de fenoles y también ejerce una acción antimicrobiana (Usseglio-Tomasset, 1998).

En el pasado, su uso ya fue cuestionado al detectarse reacciones alérgicas severas en personas asmáticas (Ortega, 2017). Esto, sumado a que en la actualidad se ha incrementado la demanda de productos más “naturales” sin aditivos químicos, apoya la idea de que su utilización esté más cuestionada y se intenten reducir sus dosis lo más posible (Izquierdo Cañas, 2016). Es por ello, que en los últimos años se ha mostrado un gran interés por el ácido ascórbico en combinación con el sulfito como alternativa para reducir las cantidades de este último en los productos (Bauernfeind & Pinkert, 1970). Se sabe que cuando se añade al mosto (o vino) este ácido, es preferencialmente oxidado de forma rápida, y da lugar a dos productos de reacción: ácido dehidroascórbico y peróxido de hidrógeno. La reacción entre el ácido ascórbico y el oxígeno es mucho más rápida, con unos tiempos medios de reacción de 35 minutos; que la que ocurre entre el  $\text{SO}_2$  y el oxígeno ya que avanza a una tasa extremadamente lenta a pH del vino (Casassa, 2009). A pesar de lo anterior se ha planteado su papel complementario y no solitario debido al número limitado de funciones inhibitoras de deterioro microbiológico, comparadas con el dióxido de azufre (Barril, Clark, & Scollary, 2012).

La aprobación del uso de ácido ascórbico y su isómero óptico, el ácido eritórbico en la producción de vinos y zumos de frutas fue llevada a cabo por el gobierno de los Estados Unidos entre 1956 y 1958 respectivamente (Zoecklein et al., 2001). Por lo tanto, este compuesto pertenece a la categoría de antioxidantes que se emplea como agente reductor para prevenir la oxidación y cuyo uso en España está sujeto a las disposiciones legales en materia de límites (Organización Internacional de la Viña y el Vino [OIV], 2019).

Este ácido tiene capacidad para proteger los compuestos tanto oxidables como de sabor, ya que puede actuar eliminando el oxígeno singlete o como un agente quelante. Los diferentes estudios llevados a cabo en el vino, han demostrado que este compuesto elimina el oxígeno molecular, antes de la oxidación de los compuestos fenólicos (Pisoschi, Pop, Serban, & Fafaneata, 2014). Además, también se comporta como un eliminador de radicales libres excelente, al reaccionar rápidamente con los radicales hidroxilo (y otros) dando lugar a unos muy poco reactivos que no se propagan con facilidad (Bradshaw et al., 2011). Por tanto, como donante de electrones, este

compuesto es uno de los antioxidantes de pequeño peso molecular más importantes que contribuye a la capacidad antioxidante total (Barril et al., 2012; Pisoschi, Cheregi, & Danet, 2009; Popa, Danet, Jipa, & Zaharescu, 2010; Popa, Danet, Silviu, & Zaharescu, 2012).

La OIV (2006) establece que se puede adicionar en la uva, mosto o en el vino siguiendo unas pautas y en unas cantidades concretas. En la uva se recomienda añadirlo antes de su trituración y la dosis usada no debe exceder de 250 mg/Kg. En el caso del mosto se sugiere agregarlo inmediatamente después de la trituración de la uva y la dosis utilizada, acumulada si es necesario, con la utilizada en las uvas, no debe exceder los 250 mg/L. Por último en el caso del vino se aconseja añadirlo durante el embotellado, de lo contrario, se oxida en presencia de aire y el producto de este fenómeno causa alteraciones oxidativas mucho más importantes en este, que las que resultan del oxígeno en el aire en ausencia de ácido ascórbico. En este último caso la cantidad usada tampoco puede exceder de 250 mg/L y si también se ha usado en uva o mosto, la concentración final, en términos de ácido ascórbico más dehidroascórbico, no debe exceder los 300 mg/L. Independientemente de dónde se adicione se recomienda combinarlo con dióxido de azufre y cumpliendo las prescripciones del Códex Enológico Internacional (Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2009).

Inicialmente, se consideró que el uso combinado de ambos compuestos tiene muchas ventajas sobre el uso de cualquiera de estos por sí solo (Barril et al., 2012). Además de reducir el nivel de dióxido de azufre, juntos ejercen un efecto favorable sobre el sabor, el color, la claridad y el aroma del vino (Bauernfeind & Pinkert, 1970; Kielhöfer & Würdig, 1959; Vecher & Loza, 1961a, 1961b). Numerosos estudios refuerzan esta descripción, siendo en los vinos blancos y dulces en los que más se ha comprobado. En un estudio Skouroumounis et al. (2005b) mostraron que la adición de 90 mg/L de ácido ascórbico en el embotellado tuvo poco impacto en el aroma del vino en los primeros 6 meses. Las diferencias, sin embargo, se hicieron evidentes a los 3 y 5 años de edad de la botella, tanto desde el punto de vista del color, como el aroma afrutado. Otros estudios revelaron que en el paladar los vinos con ácido ascórbico fueron percibidos como menos oxidados, menos maduros y frescos. Morozova, Schmidt, & Schwack (2015) comprobaron en un ensayo que al añadir 250 mg/L a los vinos los catadores percibieron una mayor intensidad de los aromas frutales y una menor de los aromas oxidados a los 6 meses posteriores a su embotellamiento. Asimismo, se comprobó que una mayor concentración de sulfito en vinos expuestos a una alta concentración de oxígeno, es menos efectiva como antioxidante y previene peor la aparición de atributos sensoriales negativos que si se usa una combinación de ambos compuestos (Barril, Rutledge,

Scollary, & Clark, 2016). Por todo lo anterior se ha visto que el ácido ascórbico proporciona una protección considerable contra la oxidación del vino blanco en condiciones de poco oxígeno y que tiene la capacidad de eliminarlo más rápidamente que en su ausencia.

Además también se ha comprobado que su combinación prolonga la vida útil de los vinos, ya que el ácido ascórbico incrementa el tiempo que tarda el dióxido de azufre libre en caer por debajo de un umbral crítico (10 mg/L) (Barril et al., 2016; Lopes et al., 2009). Hay diversos factores que van a influir en la eficacia de esta combinación de compuestos en el vino. Uno de los más importantes es el ingreso de oxígeno en el embotellado o mediante el cierre después de este. Godden et al. (2001); Lopes et al., (2009); Skouroumounis et al. (2005a) llevaron a cabo un estudio que consistió en observar el impacto de cierre de la botella con diferentes tipos de tapones que permitían atravesar más o menos oxígeno. Después de dos años comprobaron que los vinos con cierres que limitaban la entrada de oxígeno estaban libres de defectos, mientras que los que permitieron su entrada mostraban caracteres oxidativos perjudiciales. Por lo tanto es un parámetro muy importante que hay que controlar ya que, un suministro excesivo de oxígeno, conducirá a una vida más corta del vino en comparación con la del vino sin ácido ascórbico (Barril et al., 2016).

A pesar de esto, hoy en día la concentración crítica de ácido ascórbico para mantener su estado antioxidante no se ha identificado con exactitud (Kassouf et al., 2014). Además, a veces aparece por error o en unos niveles muy altos pudiendo provocar alteraciones en el sabor o el aroma, causadas por la inhibición de procesos naturales que ocurren en las bebidas y alimentos (Wawrzyniak, Ryniecki, & Zembrzuski, 2005). También este exceso, puede provocar irritación gástrica y su producto metabólico (ácido oxálico) puede causar problemas renales (Wawrzyniak et al., 2005). Por otro lado hay que tener en cuenta que a veces ejerce una función prooxidante bajo ciertas situaciones tecnológicas (Casassa, 2009). Esto se debe a que es una sustancia lábil que se degrada fácilmente por las enzimas y el oxígeno atmosférico, sobretodo con el exceso de calor, luz y cationes de metales pesados (Bhagavan, 2002; Du, Cullen, & Buettner, 2012). Algunos investigadores han propuesto utilizar el contenido residual de este ácido como índice de retención de nutrientes; ya que consideran que si este resiste los tratamientos térmicos durante el procesamiento, el resto de nutrientes se verán poco afectados (Badui, 2015; Cámara Soto & Olortegui Pajuelo, 2015). Los procedimientos analíticos son claves para fijar en los productos una cantidad concreta y se han planteado numerosos en diferentes matrices y en varios niveles de concentración, que se basan generalmente en sus propiedades reductoras o en su capacidad para producir



sustancias coloreadas (Vázquez et al., 2012). Esto se traduce en que actualmente hay una gran variedad de técnicas analíticas (Pisoschi et al., 2014), entre las que se encuentra la voltamperometría, la cual se tratará de forma detallada más adelante.

Por todo lo anterior la determinación del ácido ascórbico es de gran importancia, especialmente en química de productos alimenticios y en la evaluación de su calidad (EE.UU. Patent N.º 4,152,116, 1979). Poder cuantificar su presencia a través de las técnicas analíticas es un factor clave que nos permite asegurar que este ácido se va a encontrar en la concentración adecuada y que va a ejercer una función eficaz. Actualmente, lo que se busca es conseguir una monitorización rápida de sus niveles durante las etapas de producción y control de calidad de las bebidas y alimentos (Hsu, Ciou, & Chen, 2008; Pisoschi et al., 2009; Popa et al., 2012).

A partir de todo lo expuesto, **el objetivo** de este Trabajo Fin de Master ha sido realizar una revisión bibliográfica acerca de la determinación voltamperométrica de ácido ascórbico en el vino, haciendo alusión al resto de técnicas y a su cuantificación en otras bebidas de forma general.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

---

Se ha realizado una revisión bibliográfica en la que se han empleado las siguientes bases de datos documentales:

- Google académico (<https://scholar.google.es/>).
- Science Direct, de la editorial Elsevier (<https://www.sciencedirect.com/>).
- Sistema de Información Científica Redalyc (<http://www.redalyc.org/home.oa>).  
(Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal)
- Springer, de la editorial del mismo nombre (<https://www.springer.com/gp>).
- Wiley online, de la editorial Blackwell-Wiley (<https://onlinelibrary.wiley.com/>).

- Como criterios de inclusión se han considerado:

1. Artículos publicados en los últimos 40 años.
2. Artículos que investiguen los diferentes métodos para la determinación del ácido ascórbico.
3. Artículos redactados en inglés o español.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---

El diseño, desarrollo y optimización de las diferentes técnicas analíticas para controlar la calidad de los productos constituye un enfoque de investigación y un interés cada vez mayor. Su fin es la determinación cualitativa y cuantitativa de los aditivos e ingredientes alimentarios, así como de los contaminantes, con el objetivo de identificar una posible adulteración y/o contaminación en los productos (Pisoschi, 2012; Pisoschi et al., 2014). La literatura científica aporta numerosos estudios en los que se han desarrollado estas técnicas, con el objetivo de determinar la cantidad de ácido ascórbico presente en las bebidas.

#### **1. Técnicas analíticas para la determinación del ácido ascórbico.**

Para su determinación teniendo en cuenta sus propiedades fisicoquímicas se han desarrollado distintas técnicas analíticas, (Gutiérrez, Hoyos, & Páez, 2007).

Uno de los parámetros más importantes que hay que considerar a la hora de desarrollar y optimizar los distintos métodos analíticos es la validación. Requisito previo fundamental que permite evaluar la capacidad que tienen estos para generar datos analíticos confiables, demostrando que se mide la sustancia correcta, en la cantidad y en el rango correcto para las muestras previstas (Araujo, 2009; Bansal & Destefano, 2007; Singh, 2013; Spínola, Llorent-martínez, & Castilho, 2014). Si los datos obtenidos no son de calidad o carecen de confiabilidad, la determinación que resulte será poco fiable (Peters, Drummer, & Musshoff, 2007; Rogers, 2013).

Los numerosos intentos por cuantificar el ácido ascórbico han dado lugar a que la literatura este repleta de un gran número de métodos (ANEXO I) para su análisis en diferentes productos. Sin embargo, los esfuerzos continúan en la búsqueda de un método más rápido y eficaz (Arya, Mahajan, & Jain, 2000).

Los métodos de análisis preferidos son los de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), ya que aportan una sensibilidad y selectividad mayor que los espectrofotométricos, de titulación o enzimáticos y generalmente no necesitan derivación. Los más usados han sido la detección ultravioleta (UV) o electroquímica (DE). A diferencia de la detección de fluorescencia (FD) (que requiere derivación de DHA y oxidación adicional de AA a DHA) o la detección de espectrometría de masas (MS) que es raro que proporcionen la mayor sensibilidad y selectividad. Sobre todo esta

última, que tiene altos costos de funcionamiento lo que hace que sea inaccesible para muchos laboratorios (Nováková, Solich, & Solichová, 2008).

Generalmente, los métodos electroquímicos que se caracterizan por la respuesta rápida, la selectividad y sensibilidad, bajo coste así como por la simplicidad del procedimiento analítico e instrumental, y que no requieren un tratamiento previo de la muestra complicado se prefieren a los métodos instrumentales tradicionales para la determinación a tiempo real y con exactitud del ácido ascórbico (Pisoschi, 2013a; Pisoschi et al., 2014).

Con el fin de mejorar el rendimiento para la evaluación de la vitamina C en los últimos años, se han desarrollado diferentes modalidades de sensores, desde descubiertos hasta modificados químicamente. Recientemente, los avances apuntan al uso de nanotubos de carbono y varios compuestos, que mejoran en gran medida la señal analítica debido a su amplia área de superficie y su actividad electrocatalítica. Asimismo, disminuyen el potencial máximo correspondiente a la oxidación del ácido ascórbico resolviendo los problemas de solapamiento de picos en las muestras complejas (Pisoschi et al., 2014).

En definitiva, la eficacia de un método u otro va a depender de una serie de factores. Uno de los más importantes es a la hora de seleccionar el método a llevar a cabo, ya que hay que tener en cuenta una serie de parámetros como las características del analito, el propósito del análisis, la matriz y los recursos analíticos disponibles (Pinto et al., 2010; Spínola et al., 2014).

## **2. ¿Qué es la voltamperometría?**

El método electroquímico que hoy en día se conoce como voltamperometría surgió a partir del descubrimiento de la polarografía, en 1922 por el químico Jaroslav Heyrovsky. Desde sus inicios experimentó una serie de dificultades, no obstante, en los años sesenta y setenta se llevaron a cabo avances significativos en todas las áreas de esta técnica (metodología, instrumentación y teoría), lo que supuso una gran mejora de la sensibilidad y permitió ampliar el repertorio de métodos analíticos (Kounaves, 1997).

Comprende un conjunto de métodos electroanalíticos en los que la información sobre el analito se obtiene al medir la intensidad de corriente en función del potencial aplicado en condiciones que promuevan la polarización de un indicador, o el funcionamiento del electrodo (Skoog, Holler, & Crouch, 2017). Todos estas técnicas comparten una característica común, y es que involucran la aplicación de un potencial (E) a un electrodo

y el monitoreo de la corriente resultante ( $i$ ) que fluye a través de la celda electroquímica. En muchos casos, el potencial aplicado varía o la corriente se monitorea durante un período de tiempo ( $t$ ). Por lo tanto, todas pueden describirse como alguna función de  $E$ ,  $i$  y  $t$ , y se consideran técnicas activas ya que, el potencial aplicado fuerza un cambio en la concentración de una especie electroactiva en la superficie del electrodo al reducirla u oxidarla electroquímicamente (Kounaves, 1997).

El proceso implica la electrólisis de una o más especies electroactivas, lo que conlleva su reacción en el electrodo y el mecanismo de transferencia de masa. Este último puede llevarse a cabo por migración (movimiento de especies por diferencia de carga), difusión (movimiento de las especies por gradiente de concentración) y convección (movimiento de la materia por cambios físicos) (Ortíz, Martínez, & Hernández, 2006). El registro se denomina voltamperograma. En este por medio de la variación de las velocidades de barrido e intervalos de potencial podemos observar como una serie de picos aparecen y desaparecen, notando las diferencias que existen entre el primero y los barridos subsiguiente (Harvey & Rodríguez, 2002).

Los componentes básicos de un sistema electroanalítico para una voltamperometría son: un potencióstato, un ordenador y una celda electroquímica (Kounaves, 1997).

Este conjunto de técnicas presentan una serie de ventajas analíticas, ya que poseen una excelente sensibilidad con un gran rango de concentración lineal útil tanto para especies orgánicas como inorgánicas y también un gran número de disolventes y electrolitos. Asimismo, los rangos de temperatura son muy amplios y proporcionan unos tiempos de análisis rápidos (segundos), lo que permite la determinación simultánea de varios analitos y la capacidad de estimar razonablemente los valores de parámetros desconocidos (Kounaves, 1997).

Según el tipo de barrido que se realice se distinguen varias técnicas: voltamperometría cíclica (CV), voltamperometría de pulso diferencial (DPV), voltamperometría de barrido lineal (LSV), voltamperometría de onda cuadrada (SWV) y voltamperometría de extracción (SV) (Chandra & Segal, 2016; Mahato et al., 2018).

Actualmente se están estudiando diferentes variaciones de esta técnica con el fin de mejorarla. Como consecuencia de ello, este método cada vez es más popular para la cuantificación del ácido ascórbico en muestras reales (Wawrzyniak et al., 2005).

### 3. Determinación del ácido ascórbico en bebidas

En los últimos años, la determinación de este ácido ha pasado a ser un tema de gran importancia en el campo de la bioquímica y los alimentos comerciales. Su concentración va a afectar a la calidad de los productos por ejemplo, evitando la degradación de los refrescos y los zumos o ayudándolos a conservar su sabor (Chen & Sato, 1995; Horwitz, Chichilo, & Reynolds, 1980). También se usa como acidulante de alimentos en la fabricación de bebidas de frutas y verduras (Shui & Leong, 2002) y como antioxidante en las cervezas y los vinos (Marshall, Trenerry, & Thompson, 1995). Además una concentración anormal en los fluidos humanos de esta sustancia está asociado con diversas enfermedades (Zuo, Zhou, Zuo, & Deng, 2015). Por todo lo anterior, es importante poder cuantificar con precisión la cantidad de esta vitamina presente en los alimentos para fines de control de calidad y etiquetado, entre otros (Shui & Leong, 2002). Así como para evaluar su estabilidad a lo largo de la vida útil del producto (Esteve, Farre, & Frígola, 1996; Fellers, 1988).

Son muchas las técnicas usadas para el análisis del ácido ascórbico en bebidas. Una de las más estudiadas por diferentes autores a lo largo del tiempo ha sido la cromatografía, aplicada sobretodo en zumos de frutas, cuya selección de fase estacionaria es crucial para conseguir una máxima resolución (de Quirós, Fernández-Arias, & López-Hernández, 2009).

En un estudio se determinó este ácido en refrescos y zumo de manzana a través de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con electroquimioluminiscencia (ELC) de Ru (bpy)  $3^{2+}$ , con el fin de mejorar su sensibilidad y selectividad. Obteniéndose que la reacción de luminiscencia entre el ácido oxidado y Ru (bpy)  $3^{2+}$  daba lugar a una detección sensible y reproducible (Chen & Sato, 1995). Otros autores de Quirós et al. (2009) propusieron utilizar una columna basada en partículas esféricas de sílice ultrapuras para HPLC como alternativa a la convencional. Para ello analizaron diecisiete muestras entre las que se encontraban zumos, bebidas isotónicas y té, observándose en los resultados que era una alternativa excelente, rápida, simple y confiable. Shui & Leong (2002) utilizaron con éxito HPLC con detección de matriz de fotodiodos (DAD) en una variedad de zumos y bebidas para separar, identificar y cuantificar los ácidos orgánicos y así pudieron comprobar si existía cierto deterioro microbiológico en las bebidas. En otro estudio, se describió un método cromatográfico capilar electrocinético (MECC) rápido para cuantificar L-ascórbico en cerveza y zumos de fruta. Se usó un tampón modificado con desoxicolato de sodio y una columna capilar de sílice fundida, con el fin de sustituir a la HPLC que es una técnica cara. Los resultados fueron

favorables, pues los valores obtenidos de ácido con esta técnica fueron muy similares a los conseguidos con HPLC (Li, 1992; Marshall et al., 1995). La cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) fue desarrollada por Zuo et al. (2015) como alternativa a la HPLC de fase inversa (RP). Su objetivo era conseguir que las moléculas polares pequeñas tuvieran una buena retención, cosa que no ocurría en HPLC (Sidorova & Grigoriev, 2012; Zhou et al., 2013) y para ello usaron muestras de leche de vaca y zumo de naranja para determinar ácido ascórbico, ácido úrico y creatinina. Consiguiendo así un método selectivo, rápido, preciso y que presentaba una buena sensibilidad y linealidad de los resultados.

Por otro lado, autores como Luque-Pérez, Ríos, & Valcárcel (2000) propusieron dos métodos espectrofotométricos, uno fotoquímico basado en la reacción redox que tiene lugar entre el ácido ascórbico y el Fe (III), y uno no fotoquímico con la misma base, pero junto a una irradiación con luz visible para mejorar la reacción redox. Se aplicó en el análisis de bebidas de naranja, limón, piña y en una cerveza con ácido ascórbico, cuyos resultados obtenidos mostraron que ambos eran métodos rápidos, presentando el fotoquímico una mayor sensibilidad y el no fotoquímico una mayor selectividad. En otro estudio Lau, Luk, & Wong (1986) desarrollaron como otros autores (Fung & Luk, 1985) un método de corrección de fondo para poder utilizar la espectrofotometría UV directa en la determinación de ácido ascórbico. Se analizaron muestras de refrescos y zumos de frutas consiguiendo un método más aplicable y eficaz.

Por último dentro de las técnicas electroquímicas las más eficaces son la voltamperometría cíclica, de onda cuadrada y diferencial de pulso (André, Castanheira, Cruz, Paseiro, & Sanches-Silva, 2010; Prior & Cao, 1999).

La voltamperometría cíclica (CV) es la técnica más utilizada para obtener información cualitativa sobre las propiedades y características de los procesos electroquímicos (Hoyos-Arbeláez, Vázquez, & Contreras-Calderón, 2017; Sawyer, Sobkowiak, & Roberts Jr, 1995). Existen numerosos trabajos de CV en los que se usan electrodos y se monitorean parámetros diferentes. Se han llevado a cabo ensayos que utilizan CV con electrodo de carbón vítreo (GCE) para la determinación de ácido ascórbico en zumo de frutas (Sartori & Fatibello-Filho, 2012), de naranja (Sousa, da Rocha, Cardoso, Silva, & Zanoni, 2004), de grosellas negras (Milardović, Iveković, & Grabarić, 2006), en té de frutas (Piljac-Žegarac, Valek, Stipčević, & Martinez, 2010), en infusión de jengibre (Chaisuksant, Damwan, & Poolkasem, 2010) y en refrescos (Taye & Sergawie, 2019). Otros estudios han usado CV con electrodo de pasta de carbono (CPE) en bebidas de café (Oliveira-Neto et al., 2016), zumos de frutas (naranja, kiwi, manzana, y limón), zumos vegetales (rábano, tomate, pimiento, puerro y cebolla) (Gheibi, Karimi-Maleh,

Khalilzadeh, & Bagheri, 2015; Keyvanfard, Shakeri, Karimi-Maleh, & Alizad, 2013) y refrescos de naranja y limón (Danet et al., 2009). Se han llevado a cabo modificaciones utilizando CV con un electrodo de carbono vítreo con nanotubos de carbono de pared múltiple dentro de una película de poli (clorhidrato de alilamina) para la determinación simultánea de ácido ascórbico y sulfito en zumos de frutas (Sartori & Fatibello-Filho, 2012) y utilizando azul de metileno como mediador (Ensafi, 2007). Este método ha presentado numerosas ventajas ya que es suficientemente rápido, asequible y lo suficientemente sensible para determinar las concentraciones fisiológicas de los antioxidantes (Piljac-Žegarac et al., 2010).

Respecto a la voltamperometría de onda cuadrada (SWV) es una técnica diferencial de gran amplitud en la cual se aplica una forma de onda compuesta por una cuadrada simétrica, que se superpone a un potencial de escalera de base, al electrodo de trabajo (Osteryoung & Osteryoung, 1985). Los ensayos muestran como se han llevado a cabo modificaciones y se han usado diferentes tipos de electrodos para esta técnica. Autores como Barroso, Delerue-Matos, & Oliveira (2012) han evaluado la capacidad antioxidante total (TAC) de aguas aromatizadas utilizando una SWV con una modificación que consistió en un biosensor electroquímico (inmovilización de purina) sobre una superficie de electrodo de carbono vítreo (GCE). En otro estudio el biosensor electroquímico se inmovilizó en el electrodo de carbono vítreo (GC) de grafeno nanoribbon (GNR) en zumos de frutas comerciales (naranja, uva y pera), lo que permitió obtener mayor sensibilidad (Yang et al., 2013). De esta manera evaluaron la actividad antioxidante a través del análisis del poder protector de los antioxidantes frente al ataque de los radicales hidroxilo en las bases de purina. También se ha desarrollado una SWV para la determinación simultánea de ácido ascórbico (AA) y cafeína (CAF) en bebidas frías y café utilizando un electrodo de carbono vítreo (GCE) modificado con nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) (Gupta, Jain, & Shoora, 2013). En otros ensayos se ha aplicado una SWV de inyección de flujo para la cuatificación de ácido en refrescos, té de limón y zumos de manzana (Fung & Mo, 1992). Además esta técnica se ha utilizado en té verde y negro, en zumos dulces y agrios de limón y naranja y en refrescos (Nezamzadeh, Amini, & Faghihian, 2007; Novak, Šeruga, & Komorsky-Lovrić, 2010; Pisoschi, Pop, Negulescu, & Pisoschi, 2011; Taye & Sergawie, 2019).

En relación a la voltamperometría diferencial de impulsos (DPV), es una técnica en la que los impulsos de magnitud fija se superponen en una rampa de potencial lineal (Hoyos-Arbeláez et al., 2017). La literatura científica recoge numerosos estudios en los cuáles se emplean diferentes tipos de electrodos, siendo los más usados el carbono vítreo y la pasta de carbono (Hoyos-Arbeláez et al., 2017). Estos últimos han sido

aplicados en varias bebidas como café (Oliveira-Neto et al., 2016), mosto, néctar de frutas (Lino et al., 2013) y en zumos frescos y deshidratados (Lechien, Valenta, Ntirnberg, & Patriarcho, 1982). Por otro lado los primeros han sido estudiados en zumos de frutas (Yilmaz, 2008), y en bebidas alcohólicas como brandy y cognac (Ziyatdinova, Salikhova, & Budnikov, 2014). Además con el objetivo de mejorar su sensibilidad algunos autores han desarrollado modificaciones como Kingsley, Desai, & Srivastava (2015) que aplicaron en zumos de frutas una DPV con nanopartículas de  $Fe_3O_4$  en forma de electrodo de pasta de carbono, Korotkova, Karbainov, & Shevchuk (2002) que utilizaron para la determinación de ácido ascórbico en extracto de té verde y vinagre de manzana una DPV usando como electrodo una película de mercurio y Vázquez et al. (2012) que desarrollaron un electrodo de pasta de carbono modificado con Cu (II)-Ftalociana para su determinación en zumos comerciales.

De forma general los estudios reflejan que las técnicas electroquímicas permiten obtener una determinación de la vitamina C en las bebidas simple, rápida, económica con buenos límites de detección y con una gran sensibilidad. Han demostrado ser unas técnicas capaces de cuantificar este compuesto en presencia de otros que pueden enmascararlo y son capaces a diferencia de otros métodos de realizar una cuantificación directa cuando se analiza en muestras coloreadas con altos niveles de antocininas como es el caso de los zumos de frutas (Lino et al., 2013; Medeiros, Rocha-filho, & Fatibello-filho, 2010; Sousa et al., 2004).

#### **4. Método oficial para la determinación del ácido ascórbico en el vino.**

La OIV en su compendio de Métodos de Análisis Internacionales para vinos y mosto, establece los métodos oficiales para la determinación del ácido ascórbico en los vinos. Los cuáles son reconocidos por la Unión Europea ya que en el Reglamento (CE) nº 479/2008 (Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2008) se señala que, los métodos de análisis para establecer la composición de los productos cubiertos por dicho Reglamento y las normas para verificar si dichos productos han sido sometidos a procesos que violan las prácticas enológicas autorizadas, son los recomendados y publicados por la OIV en su compendio. Para la cuantificación de este ácido en el documento se exponen dos métodos, uno de categoría II (MÉTODO DE BENCHMARK) y otro de categoría IV (MÉTODO AUXILIAR) junto con las medidas a seguir y los materiales necesarios para llevarlos a cabo (OIV, 2019b).



El primer método OIV-MA-AS313-22 (Resolución Oeno 377/2009) consiste en una **Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) y detección de UV** en un rango de 3 mg/L a 150 mg/L. Este método es adecuado para la determinación simultánea de ácido L-ascórbico y D-iso-ascórbico (ácido eritórbico) en vino. Si la muestra supera los 150 mg/L previamente habría que diluirla (OIV, 2019b).

El segundo método OIV-MA-AS313-13 A (Resolución Oeno 377/2009), consiste en una **Espectrometría de fluorescencia o Espectrofluorimetría** que permite determinar la presencia de ácido L-ascórbico y dehidroascórbico en vinos o en mostos. El ácido ascórbico se convierte con carbón activado en ácido dehidroascórbico, formando un compuesto fluorescente en la reacción con ortofenilendiamina (OPDA). Para determinar esta fluorescencia se necesita preparar un control (formación de un complejo de ácido bórico/ ácido deshidroascórbico). La muestra y el control se analizan fluorométricamente y mediante espectrofluorimetría se calcula la concentración del ácido dehidroascórbico (OIV, 2019b).

## 5. Determinación voltamperométrica del ácido ascórbico en el vino.

Las decisiones sobre el alcance de la exposición al oxígeno y la aplicación de antioxidantes en los vinos, van a ser determinantes en su calidad. Un vino excesivamente oxidado adopta un color marrón y pierde sus aromas frutales, mientras que uno con un contenido bajo de oxígeno adquiere un olor graso (Kilmartin, 2016). El oxígeno disuelto presente en el vino, se puede consumir por reacción con el resto de sus componentes y originar cambios perjudiciales. Esto se puede evitar con el uso de un antioxidante en una concentración adecuada ya que, si su presencia causa un desequilibrio respecto a las especies reactivas se produce el fenómeno de estrés oxidativo (Barril et al., 2016; Hernanz-Vila, Jara-Palacios, Escudero-Gilete, & Heredia, 2017).

El uso en la elaboración del vino, del ácido ascórbico como complemento del dióxido de azufre, se debe a que es capaz de proteger a otros constituyentes oxidables del vino como son los compuestos fenólicos y de sabor, ya que elimina el oxígeno molecular antes de la oxidación de estos (Bradshaw et al., 2011). Por tanto, la capacidad antioxidante del vino se puede relacionar con la presencia de sustancias tanto endógenas como exógenas es decir, con algunos compuestos fenólicos para el primer grupo y dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) y ácido ascórbico (AA) para el segundo. Un equilibrio

entre la composición del vino y la exposición al oxígeno da lugar a la llamada "resistencia a la oxidación", que va a limitar su vida útil (Rodrigues, Silva Ferreira, Guedes de Pinho, Bento, & Geraldo, 2007).

A la hora de analizar los ensayos realizados para la cuantificación de este ácido en vino a través de técnicas voltamperométricas se ha observado que los ensayos son escasos. Las técnicas espectrofotométricas y las cromatográficas han sido las más estudiadas. Esto podría deberse a que la voltamperometría es una técnica que se ha utilizado para estimar el potencial antioxidante total del extracto fenólico de los vinos (Hernanz-Vila et al., 2017).

A pesar de lo anterior, se ha observado que las técnicas espectrofotométricas no permiten la medición directa de muestras coloreadas y a veces presentan dificultades al medir ya que son propensas a la interferencia de otros agentes reductores que puedan estar presentes en la muestra (Ensafi, 2007; Floegel, Kim, Chung, Koo, & Chun, 2011). En el caso de los métodos cromatográficos, estos son capaces de eliminar esas interferencias antes de la detección, sin embargo, consumen mucho tiempo (Macrae, 1988). Es por esto, que en los últimos 20 años se están llevando a cabo investigaciones con el objetivo de desarrollar métodos voltamperométricos con mayor sensibilidad y selectividad, a través del uso de electrodos modificados químicamente o con el uso de compuestos electrocatalíticos. Autores como Bradshaw, Prenzler, & Scollary (2002) han usado para la determinación de ácido ascórbico en vino base una voltamperometría de onda cuadrada (SWV) con un electrodo colgante de gota de mercurio (HMDE). La voltamperometría cíclica (VC) se ha llevado a cabo en un estudio para la determinación de este ácido en vinos blancos (Sauvignon Blanc, Chardonnay) y tintos (Pinot noir, Merlot) (Beer et al., 2004; Makhotkina & Kilmartin, 2009), también con el uso de un electrodo de carbono vítreo (Kilmartin, Zou, & Waterhouse, 2001). Otro ensayo ha desarrollado una VC con electrodo de calomelanos (SCE) en vino blanco para la cuantificación de este ácido (Rodrigues et al., 2007). Türke, Fischer, Beaumont, & Kilmartin (2012) han investigado el uso de VC con un electrodo de PEDOT sobre sustratos de carbón activados para estudiar la electroquímica del ácido ascórbico en un vino modelo de pH 3,3. También la voltamperometría de barrido lineal ha sido usada, para la determinación de este ácido en vinos blancos (Gonzalez, Vidal, & Ugliano, 2018).

Otro tipo de ensayos que muestra la literatura científica, consisten en comparar 2 métodos voltamperométricos usando diferentes electrodos con el fin de establecer cuál es el más eficaz. Pisoschi et al. (2011) llevaron a cabo un estudio en el que aplicaron una voltamperometría cíclica (CV) y una de pulso diferencial con electrodos de pasta de carbono (CPE) y de platino (PT) en vino para la determinación del ácido ascórbico. Los

resultados que obtuvieron fueron que los límites de cuantificación y de detección fueron mayores usando la VC y el electrodo de platino (PT). En esta línea, un estudio se ha llevado a cabo recientemente por Taye & Sergawie (2019). Consistió en investigar la determinación de ácido ascórbico mediante voltamperometría de onda cuadrada (SWV) y cíclica (VC) con un electrodo de carbono vítreo en vino tinto y blanco. Los resultados obtenidos fueron que la SWV es más adecuada para la determinación cuantitativa de vitamina C en vinos.

## **5. CONCLUSIONES**

---

Teniendo en cuenta todo lo expuesto en el trabajo, y a modo de conclusión, es cada vez más importante la determinación del ácido ascórbico tanto en las bebidas no alcohólicas como en las alcohólicas, como es el caso del vino. Su creciente importancia se debe a que comúnmente la medición de su contenido evalúa la calidad del producto alimentario, parámetro que cada vez está más valorado por parte de los consumidores. En lo que respecta al número de técnicas empleadas para su cuantificación se ha visto que son muy variadas. En el caso concreto del vino y la voltamperometría, los estudios son escasos, sin embargo la búsqueda de métodos rápidos, simples, reproducibles y con gran sensibilidad y selectividad ha dado lugar a que el interés por investigar y desarrollar estas técnicas cada vez sea mayor. Los resultados de los ensayos realizados hasta el momento, muestran que esta técnica ofrece límites de cuantificación bajos, apenas requiere preparación de la muestra, brinda un análisis rápido y no necesita un equipo costoso. Todo esto la convierte en una alternativa atractiva a los métodos espectrofotométricos y cromatográficos tradicionales, en particular en el control de calidad de los vinos.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

---

- Amerine, M. A., & Ough, C. S. (1974). *Wine and Must Analysis*. New York: John Wiley and Sons.
- André, C., Castanheira, I., Cruz, J. M., Paseiro, P., & Sanches-Silva, A. (2010). Analytical strategies to evaluate antioxidants in food: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 21(5), 229-246. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.12.003>.
- Araujo, P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation &. *Journal of Chromatography B journal*, 877(23), 2224-2234. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.09.030>.
- Arya, S. P., Mahajan, M., & Jain, P. (2000). Non-spectrophotometric methods for the determination of Vitamin C. *Analytica Chimica Acta*, 417(1), 1-14. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)00909-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)00909-0).
- Badui, S. D. (2015). *Química de los alimentos* (5.<sup>a</sup> ed.). Mexico: Alambra.
- Ball, B. (1998). *Bioanalysis and analysis of vitamins in food*. London: Champan and Hall.
- Bansal, S., & Destefano, A. (2007). Key Elements of Bioanalytical Method Validation for Small Molecules. *The AAPS journal*, 9(1), 109-114. <https://doi.org/https://doi.org/10.1208/aapsj0901011>.
- Barceló, J. G. (1990). Acidez. En *Técnicas analíticas para vinos* (pp. 5-34). Barcelona: GAB Sistemática Analítica S.L.
- Barril, C., Clark, A. C., & Scollary, G. R. (2012). Chemistry of ascorbic acid and sulfur dioxide as an antioxidant system relevant to white wine. *Analytica Chimica Acta*, 732, 186-193. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.011>.
- Barril, C., Rutledge, D. N., Scollary, G. R., & Clark, A. C. (2016). Ascorbic acid and white wine production : a review of beneficial. *Australian journal of grape and wine research*, 22(2), 169-181. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12207>.
- Barroso, M. F., Delerue-Matos, C., & Oliveira, M. B. P. P. (2012). Electrochemical evaluation of total antioxidant capacity of beverages using a purine-biosensor. *Food Chemistry*, 132(2), 1055-1062. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.072>.
- Bauernfeind, J. C., & Pinkert, D. M. (1970). Food Processing with Added Ascorbic Acid. *In Advances in food research*, 18, 219-315. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60371-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60371-7).
- Beer, D. De, Harbertson, J. F., Kilmartin, P. A., Roginsky, V., Barsukova, T., Adams, D. O., & Waterhouse, A. L. (2004). Phenolics : A Comparison of Diverse Analytical Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 4(55), 389-400.
- Bhagavan, N. V. (2002). *Medical biochemistry* (4.<sup>a</sup> ed.). Academic Presh.

- Boulton, R. B., Singleton, V. ., Bisson, L. F., & Kunkee, R. E. (2002). La acidez de los mostos y de los vinos. En R. B. Boulton, V. L. Singleton, L. F. Bisson, & R. E. Kunkee (Eds.), *Teoría y práctica de la elaboración del vino* (pp. 547-563). Zaragoza: ACRIBIA,S.A.
- Bradshaw, M. P., Barril, C., Clark, A. C., Prenzler, P. D., & Scollary, G. R. (2011). Ascorbic acid: A review of its chemistry and reactivity in relation to a wine environment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(6), 479-498. <https://doi.org/10.1080/10408391003690559>.
- Bradshaw, M. P., Prenzler, P. D., & Scollary, G. R. (2002). Square-Wave Voltammetric Determination of Hydrogen Peroxide Generated from the Oxidation of Ascorbic Acid in a Model Wine Base. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 14, 546-550.
- Cámara Soto, D., & Olortegui Pajuelo, T. (2015). *Determinación de Ácido Ascórbico por titulación visual con 2.6 diclorofenolindofenol*. Universidad de Lima.
- Casassa, F. (2009). Glutation, Ácido ascórbico y SO<sub>2</sub> viejos conocidos, nuevos conceptos. *Enología*, 5, 1-19. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/259581355>.
- Chaisuksant, R., Damwan, K., & Poolkasem, A. (2010). Simple electrochemical methods for antioxidant capacity test. In *Asia Pacific Symposium on Postharvest Research, Education and Extension*, 943, 297-302. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.943.41>.
- Chandra, P., & Segal, E. (2016). *Nanobiosensors for personalized and onsite biomedical diagnosis* (2.ª ed.). The Institution of Engineering and Technology.
- Chen, X., & Sato, M. (1995). High-performance liquid chromatographic determination of ascorbic acid in soft drinks and apple juice using tris (2, 2'-bipyridine) ruthenium (II) electrochemiluminescence. *Analytical sciences*, 11(5), 749-754. <https://doi.org/https://doi.org/10.2116/analsci.11.749>.
- Clarke, R. J., & Bakker, J. (2010). Componentes estimulantes y básicos del sabor del vino. En *Química del flavor del vino* (pp. 69-122). Zaragoza: ACRIBIA,S.A.
- Danet, A. F., Pisoschi, A. M., & Kalinowski, S. (2009). Ascorbic acid determination in commercial fruit juice samples by cyclic voltammetry. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, 2008, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2008/937651>.
- Danilewicz, J. C. (2016). Reaction of oxygen and sulfite in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 67(1), 13-17. <https://doi.org/10.5344/ajev.2015.15069>.
- de Quirós, A. R. B., Fernández-Arias, M., & López-Hernández, J. (2009). A screening method for the determination of ascorbic acid in fruit juices and soft drinks. *Food Chemistry*, 116(2), 509-512. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.013>.
- Du, J., Cullen, J. J., & Buettner, G. R. (2012). Ascorbic acid : Chemistry , biology and the treatment of cancer. *Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1826(2), 443-457. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.06.003>.

- Ensafi, A. A. (2007). Determination of Ascorbic Acid by Electrocatalytic Voltammetry with Methylene Blue Determination of Ascorbic Acid by Electrocatalytic Voltammetry. *Analytical Letters*, 36(3), 37-41. <https://doi.org/10.1081/AL-120018250>.
- España. (2003). Ley 24/2003, de 10 de julio, de la Viña y del Vino. *Boletín Oficial del Estado*, 11 de julio de 2003, (165), 27165-27179.
- Esteve, M. J., Farre, R., & Frígola, A. (1996). Stability of ascorbic acid in orange juices after initial use at home begins. *Journal of food quality*, 19(3), 243-249. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.1996.tb00419.x>.
- Fang, Z. (2016). *Métodos analíticos para la determinación de vitamina C en alimentos*. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia.
- Fellers, P. J. (1988). Shelf life and quality of freshly squeezed, unpasteurized, polyethylene-bottled citrus juice. *Journal of Food Science*, 53(6), 1699-1702.
- Floegel, A., Kim, D., Chung, S., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of food composition and analysis. Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043-1048. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008>.
- Fung, Y. S., & Luk, S. F. (1985). Determination of ascorbic acid in soft drinks and fruit juices. Part 1. Background correction for direct ultraviolet spectrophotometry. *Analyst*, 110(2), 201-204.
- Fung, Y. S., & Mo, S. Y. (1992). Application of square-wave voltammetry for the determination of ascorbic acid in soft drinks and fruit juices using a flow-injection system. *Analytica Chimica Acta*, 261(1-2), 375-380. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(92\)80216-T](https://doi.org/10.1016/0003-2670(92)80216-T).
- Gheibi, S., Karimi-Maleh, H., Khalilzadeh, M. A., & Bagheri, H. (2015). A new voltammetric sensor for electrocatalytic determination of vitamin C in fruit juices and fresh vegetable juice using modified multi-wall carbon nanotubes paste electrode. *Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 276-284. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1026-7>.
- Godden, P., Francis, L., Field, J., Gishen, M., Coulter, A., Valente, P., ... Robinson, E. (2001). Wine bottle closures: physical characteristics and effect on composition and sensory properties of a Semillon wine 1. Performance up to 20 months post-bottling. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7(2), 64-105. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2001.tb00196.x>.
- Gómez-Limón Rodríguez, J. A. (2006). El Sector Vitivinícola en Castilla y León. En M. Ibañez Rodríguez & T. Sánchez Nieto (Eds.), *El lenguaje de la vid y el vino y su traducción* (pp. 49-64). Valladolid: Universidad de Valladolid, Secretariado de Publicaciones e Intercambio Editorial.
- Gonzalez, A., Vidal, S., & Ugliano, M. (2018). Untargeted voltammetric approaches for characterization of oxidation patterns in white wines. *Food Chemistry*, 269, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.104>.

- Gupta, V. K., Jain, A. K., & Shoorá, S. K. (2013). Multiwall carbon nanotube modified glassy carbon electrode as voltammetric sensor for the simultaneous determination of ascorbic acid and caffeine. *Electrochimica Acta*, 93, 248-253. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.01.065>.
- Gutiérrez, T. M., Hoyos, O. L., & Páez, M. I. (2007). Determinación del contenido de Ácido Ascórbico en uchuva (*Physalis peruviana* L.), por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 5(1), 70-79.
- Harvey, D., & Rodríguez, L. C. (2002). Métodos espectrocópicos de análisis. En *Química analítica moderna* (pp. 353-368). McGraw-Hill.
- Hernanz-Vila, D., Jara-Palacios, M. J., Escudero-Gilete, M. L., & Heredia, F. J. (2017). Applications of Voltammetric Analysis to Wine Products. *Applications of the Voltammetry*, 109. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/67696>.
- Horwitz, W., Chichilo, P., & Reynolds, H. (1980). *Official methods of analysis* (13.<sup>a</sup> ed.). Washington, D.C.: Association of Official Analytical Chemists.
- Hoyos-Arbeláez, J., Vázquez, M., & Contreras-Calderón, J. (2017). Electrochemical methods as a tool for determining the antioxidant capacity of food and beverages: A review. *Food Chemistry*, 221, 1371-1381. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.017>.
- Hsu, P. F., Ciou, W. L., & Chen, P. Y. (2008). Voltammetric study of polyviologen and the application of polyviologen-modified glassy carbon electrode in amperometric detection of vitamin C. *Journal of Applied Electrochemistry*, 38(9), 1285-1292. <https://doi.org/10.1007/s10800-008-9555-x>.
- Izquierdo Cañas, P. M. (2016). Elaboración de vinos sin o con bajas dosis de sulfitos. *10º encuentro técnico de la semana vitivinícola*, 9-19. Madrid: Fundación para la cultura del vino.
- Kassouf, A., El Rakwe, M., Chebib, H., Ducruet, V., Rutledge, D. N., & Maalouly, J. (2014). Independent components analysis coupled with 3D-front-face fluorescence spectroscopy to study the interaction between plastic food packaging and olive oil. *Analytica Chimica Acta*, 839, 14-25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.06.035>.
- Keyvanfard, M., Shakeri, R., Karimi-Maleh, H., & Alizad, K. (2013). Highly selective and sensitive voltammetric sensor based on modified multiwall carbon nanotube paste electrode for simultaneous determination of ascorbic acid, acetaminophen and tryptophan. *Materials Science and Engineering C*, 33(2), 811-816. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.11.005>.
- Kielhöfer, E., & Würdig, G. (1959). The mutual influence of sulfurous and ascorbic acid in winelike synthetic solutions and in wine. *weingberg Keller*, 6, 21-31.
- Kilmartin, P. A. (2016). Electrochemistry applied to the analysis of wine : A mini-review. *Electrochemistry Communications*, 67, 39-42. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2016.03.011>.

- Kilmartin, P. A., Zou, H., & Waterhouse, A. L. (2001). A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(4), 1957-1965. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf001044u>.
- Kingsley, M. P., Desai, P. B., & Srivastava, A. K. (2015). Simultaneous electro-catalytic oxidative determination of Ascorbic acid and Folic acid using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles modified carbon paste electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2014.12.039>.
- Korotkova, E. I., Karbainov, Y. A., & Shevchuk, A. V. (2002). Study of antioxidant properties by voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 518(1), 56-60. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(01\)00664-7](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(01)00664-7).
- Kounaves, S. P. (1997). Voltammetric Techniques. En F. Settle (Ed.), *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry* (pp. 709-726). Prentice Hall.
- Lai, M. B. (2018). Consumer behavior toward wine products. En C. Santini & A. Cavicchi (Eds.), *Case Studies in the Wine Industry* (1.<sup>a</sup> ed., pp. 33-46). Napoli: Elsevier Ltd.
- Lau, O., Luk, S., & Wong, K. (1986). Background correction method for the determination of ascorbic acid in soft drinks, fruit juices and cordials using direct ultraviolet spectrophotometry. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 111(8), 665-670.
- Lechien, A., Valenta, P., Ntirberg, H. W., & Patriarche, G. J. (1982). Determination of Ascorbic Acid by Differential Pulse Voltammetry. *Analytische Chemie*, 311, 105-108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF00487606>.
- Li, S. F. Y. (1992). *Capillary electrophoresis: principles, practice and applications* (1.<sup>a</sup> ed.). Elsevier.
- Lino, F. M. A., de Sá, L. Z., Torres, I. M. S., Rocha, M. L., Dinis, T. C. P., Ghedini, P. C., ... Gil, E. S. (2013). Voltammetric and spectrometric determination of antioxidant capacity of selected wines. *Electrochimica Acta*, 13, 1-31. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.08.109>.
- Loeffler, H. J., & Ponting, J. D. (1998). Ascorbic Acid. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 27(3), 393-398. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/i560111a003>.
- Lopes, P., Silva, M. A., Pons, A., Tominaga, T., Lavigne, V., Saucier, C., ... Dubourdiou, D. (2009). Impact of oxygen dissolved at bottling and transmitted through closures on the composition and sensory properties of a Sauvignon blanc wine during bottle storage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(21), 10261-10270. <https://doi.org/doi:10.1021/jf9023257>.
- Luque-Pérez, E., Ríos, A., & Valcárcel, M. (2000). Flow injection spectrophotometric determination of ascorbic acid in soft drinks and beer. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 366(8), 857-862. <https://doi.org/10.1007/s002160051585>.
- Macrae, R. (1988). *HPLC in food analysis* (2.<sup>a</sup> ed.). Marcel Dekker.



- Mahato, K., Kumar, S., Srivastava, A., Maurya, P. K., Singh, R., & Chandra, P. (2018). Electrochemical immunosensors: fundamentals and applications in clinical diagnostics. En S. Vashist & J. Luong (Eds.), *Handbook of Immunoassay Technologies* (pp. 319-414). Academic Press.
- Makhotkina, O., & Kilmartin, P. A. (2009). Uncovering the influence of antioxidants on polyphenol oxidation in wines using an electrochemical method: Cyclic voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 633(1), 165-174. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2009.05.007>.
- Marshall, P. A., Trenerry, V. C., & Thompson, C. O. (1995). The determination of total ascorbic acid in beers, wines, and fruit drinks by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of chromatographic science*, 33(8), 426-432. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/chromsci/33.8.426>.
- Medeiros, R. A., Rocha-filho, R. C., & Fatibello-filho, O. (2010). Simultaneous voltammetric determination of phenolic antioxidants in food using a boron-doped diamond electrode. *Food Chemistry*, 123(3), 886-891. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.010>.
- Milardović, S., Iveković, D., & Grabarić, B. S. (2006). A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, 68(2), 175-180. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2005.06.005>.
- Morozova, K., Schmidt, O., & Schwack, W. (2015). Effect of headspace volume, ascorbic acid and sulphur dioxide on oxidative status and sensory profile of Riesling wine. *European Food Research and Technology*, 240(1), 205-221. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00217-014-2321-x>.
- Nezamzadeh, A., Amini, M. K., & Faghihian, H. (2007). Square-wave voltammetric determination of ascorbic acid based on its electrocatalytic oxidation at zeolite-modified carbon-paste electrodes. *International Journal of Electrochemical Science*, 2(8), 583-594.
- Novak, I., Šeruga, M., & Komorsky-Lovrić, Š. (2010). Characterisation of catechins in green and black teas using square-wave voltammetry and RP-HPLC-ECD. *Food Chemistry*, 122(4), 1283-1289. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.084>.
- Nováková, L., Solich, P., & Solichová, D. (2008). HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *Trends in Analytical Chemistry*, 27(10), 942-958. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.08.006>.
- OIV, O. I. de la V. y el V. (2006). *Código Internacional de Prácticas Enológicas* (1.<sup>a</sup> ed.). Paris: M<sup>o</sup> Agricultura, Pesca y Alimentación.
- OIV, O. I. de la V. y el V. (2019a). *Compendium of international Methods of Wine and must Analysis*. París [FRANCIA].
- OIV, O. I. de la V. y el V. (2019b). Resolución OIV-OENO 4-2007. En *Products used in enology*. París [FRANCIA].(Capítulo 3).

- Oliveira-Neto, J. R., Rezende, S. G., Reis, de F. C., Benjamin, S. R., Rocha, M. L., & de Souza Gil, E. (2016). Electrochemical behavior and determination of major phenolic antioxidants in selected coffee samples. *Food Chemistry*, 190, 506-512. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.104>.
- Ortega, R. M. R. (2017). *Alternativas al anhídrido sulfuroso en la elaboración de vinos antioxidantes de naturaleza fenólica procedentes de subproductos de la industria oleícola y enológica* (Universidad de Córdoba, Facultad de Ciencia y Tecnología). Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/dctes?codigo=114960>.
- Ortíz, R., Martínez, Y., & Hernández, R. (2006). *Técnicas Electroanalíticas, Voltamperometría*. Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias.
- Osteryoung, J., & Osteryoung, R. A. (1985). Square Wave Voltammetry. *Analytical Chemistry*, 57(1). <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ac00279a004>.
- Palacios, A., Carrillo, D., Borinaga, I., Rodriguez, F., & Zaldivar, E. (2016). Marcadores de longevidad y envejecimiento prematuro. *10º encuentro técnico de la semana vitivinícola*, 106-110. Madrid: Fundación para la cultura del vino.
- Parlamento Europeo, C. de la U. E. (2008). Reglamento (CE) N° 479/2008 DEL CONSEJO de 29 de abril de 2008 por el que se establece la organización común del mercado vitivinícola, se modifican los Reglamentos (CE) no 1493/1999, (CE) no 1782/2003, (CE) no 1290/2005 y (CE) no 3/2008 y se derogan los R. *Diario Oficial de la Unión Europea, Serie L*, (148, 6 de junio), 1-61.
- Parlamento Europeo, C. de la U. E. (2009). Reglamento (CE) N° 606/2009 DE LA COMISIÓN de 10 de julio de 2009 que fija determinadas disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) no 479/2008 del Consejo en lo relativo a las categorías de productos vitícolas, las prácticas enológicas y las restricciones aplicables. *Diario Oficial de la Unión Europea, Serie L*, (193, 24 de julio), 1-59.
- Peissenberg, U. D., Michal, G., & Beauchamp, K. (1979). *Patent N.º 4,152,116*. EE.UU.
- Peters, F. T., Drummer, O. H., & Musshoff, F. (2007). Validation of new methods. *Forensic science international*, 165(2-3), 216-224. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.05.021>.
- Piljac-Žegarac, J., Valek, L., Stipčević, T., & Martinez, S. (2010). Electrochemical determination of antioxidant capacity of fruit tea infusions. *Food Chemistry*, 121(3), 820-825. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.090>.
- Pinto, J. F., Almeida, C., Carrilho, E., Figueira, M., Gonçalves, M., Martins, A., & Silva, O. (2010). *Métodos de Análise: Nutracêuticos e alimentos funcionais*. Lisboa: Lidel-ed.
- Pisoschi, A. M. (2012). *Food Additives and Ingredients-Structures, Properties, Uses*. Bucharest: Elisavaras Edition.
- Pisoschi, A. M. (2013a). Determination of Several Food Additives and Ingredients by Electrochemical Techniques. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 2(3), 2-3. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000e140>.

- Pisoschi, A. M. (2013b). Vitamin C as Contributor to the Total Antioxidant Capacity - Importance, Occurrence, Methods of Determination. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 02(04), 1-2. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000e146>.
- Pisoschi, A. M., Cheregi, M. C., & Danet, A. F. (2009). Total antioxidant capacity of some commercial fruit juices: Electrochemical and spectrophotometrical approaches. *Molecules*, 14(1), 480-493. <https://doi.org/10.3390/molecules14010480>.
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Negulescu, G. P., & Pisoschi, A. (2011). Determination of ascorbic acid content of some fruit juices and wine by voltammetry performed at pt and carbon paste electrodes. *Molecules*, 16(2), 1349-1365. <https://doi.org/10.3390/molecules16021349>.
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Serban, A. I., & Fafaneata, C. (2014). Electrochemical methods for ascorbic acid determination. *Electrochimica Acta*, 121, 443-460. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.12.127>.
- Popa, C.-V., Danet, A. F., Jipa, S., & Zaharescu, T. (2010). Determination of total antioxidant activity of wines using a flow injection method with chemiluminescence detection. *Revista de Chimie*, 61(1), 11-16.
- Popa, C.-V., Danet, A., Silviu, J., & Zaharescu, T. (2012). Determination of Total Antioxidant Capacity of Some Fruit Juices and Noncarbonated Soft Drinks by aFIA-CL Method. *Revista de Chimie*, 63(10), 978-983.
- Prior, R., & Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(99), 1173-1181. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00203-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00203-8).
- Rankine, B. (2002). *Making Good Wine*. Sydney: PanMacmillan Australia.
- Rodrigues, A., Silva Ferreira, A. C., Guedes de Pinho, P., Bento, F., & Geraldo, D. (2007). Resistance to Oxidation of White Wines Assessed by Voltametric Means. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(26), 10557-10562. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf0723099>.
- Rogers, H. A. (2013). How Composition Methods Are Developed and Validated. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(35), 8312-8316. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf401033d>.
- Sartori, E. R., & Fatibello-Filho, O. (2012). Simultaneous Voltammetric Determination of Ascorbic Acid and Sulfite in Beverages Employing a Glassy Carbon Electrode Modified with Carbon Nanotubes within a Poly(Allylamine Hydrochloride) Film. *Electroanalysis*, 24(3), 627-634. <https://doi.org/10.1002/elan.201100691>.
- Sawyer, D. T., Sobkowiak, A., & Roberts Jr, J. L. (1995). *Electrochemistry for chemists* (2.<sup>a</sup> ed.). New York: John Wiley & Sons Inc.
- Shui, G., & Leong, L. P. (2002). Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. *chromatography A*, 977(1), 89-96. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01345-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01345-6).

- Sidorova, A. A., & Grigoriev, A. V. (2012). Determination of diagnostical markers of urolithiasis by capillary electrophoresis. *Journal of analytical chemistry*, 67(5), 478-485.
- Singh, R. (2013). HPLC method development and validation-an overview. *Journal of Pharmaceutical Education & Research*, 4(1).
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). voltammetry. En *Principles of instrumental analysis* (7.<sup>a</sup> ed., pp. 653-683). Boston: Cengage learning.
- Skouroumounis, G. K., Kwiatkowski, M. J., Francis, I. L., Oakey, H., Capone, D. L., Duncan, B., ... Waters, E. J. (2005). The impact of closure type and storage conditions on the composition , colour and flavour properties of a Riesling and a wooded Chardonnay wine during five years ' storage. *ustralian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 366-377. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00036.x>.
- Skouroumounis, G. K., Kwiatkowski, M. J., Francis, I. L., Oakey, H., Capone, D. L., Peng, Z., ... Waters, E. J. (2005). The influence of ascorbic acid on the composition , colour and flavour properties of a Riesling and a wooded Chardonnay wine during five years ' storage. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 355-368. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00035.x>.
- Sousa, W. R., da Rocha, C., Cardoso, C. L., Silva, D. H. S., & Zanoni, M. V. B. (2004). Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(5), 619-633. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.09.013>.
- Spínola, V., Llorent-martínez, E. J., & Castilho, P. C. (2014). Determination of vitamin C in foods : Current state of method validation. *Journal of Chromatography A*, 1369, 2-17. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.09.087>.
- Taye, A., & Sergawie, A. (2019). Determination of Ascorbic Acid Content of Wine and Soft Drinks by Boltammetric Techniques at Glassy Carbon Electrode. *American Journal of Life Science Researches*, 7(2), 26-48.
- Türke, A., Fischer, W. J., Beaumont, N., & Kilmartin, P. A. (2012). . Electrochemistry of sulfur dioxide, polyphenols and ascorbic acid at poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) modified electrodes. *Electrochimica Acta*, 60, 184-192. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.11.040>.
- Usseglio-Tomasset, L. (1998). El anhídrido sulfuroso en enología. En *Química Enologica* (pp. 337-350). Barcelona: Mundi-Prensa.
- Vázquez, D., Tascón, M., & Deban, L. (2012). Determination of Ascorbic Acid in Commercial Juices, on a Modified Carbon Paste Electrode, by Using a Taguchi Experimental Design. *Food Analytical Methods*, 5(3), 441-447. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9258-5>.
- Vecher, A. S., & Loza, V. M. (1961a). Effect of ascorbic acid addition on the oxidation-reduction potential and quality of champagne prepared by the reservoir method. *Tr. Krasnodarsk. Inst. Pishchevoi Prom*, 22, 139-150.

- Vecher, A. S., & Loza, V. M. (1961b). Effect of ascorbic acid on the wine used in champagne preparation. *Tr. Krasnodarsk. Inst. Pishchevoi Prom*, 22, 151-161.
- Wawrzyniak, J., Ryniecki, A., & Zembruski, W. (2005). Application of voltammetry to determine vitamin C in apple juices. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 427(2), 5-16.
- Yang, Y., Zhou, J., Zhang, H., Gai, P., Zhang, X., & Chen, J. (2013). Electrochemical evaluation of total antioxidant capacities in fruit juice based on the guanine/graphene nanoribbon/glassy carbon electrode. *Talanta*, 106, 206-211. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.12.030>.
- Yilmaz, S. (2008). Determination of Ascorbic Acid in Tablet Dosage Forms and Some Fruit Juices by DPV. *International Journal of electrochemical science*, 3, 1534-1542.
- Ziyatdinova, G., Salikhova, I., & Budnikov, H. (2014). Chronoamperometric estimation of cognac and brandy antioxidant capacity using MWNT modified glassy carbon electrode. *Talanta*, 125, 378-384. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.03.039>.
- Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., & Nury, F. S. (2001). Dióxido de Azufre y Ácido Ascórbico. En *Análisis y producción del vino* (pp. 185-198). Zaragoza: ACRIBIA, S.A.
- Zuo, R., Zhou, S., Zuo, Y., & Deng, Y. (2015). Determination of creatinine, uric and ascorbic acid in bovine milk and orange juice by hydrophilic interaction HPLC. *Food Chemistry*, 182, 242-245. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.142>.
- Zhou, S., Zuo, R., Zhu, Z., Wu, D., Vasa, K., Deng, Y., & Zuo, Y. (2013). An eco-friendly hydrophilic interaction HPLC method for the determination of renal function biomarkers, creatinine and uric acid, in human fluids. *Analytical Methods*, 5(5), 1307-13011.

**ANEXO I**

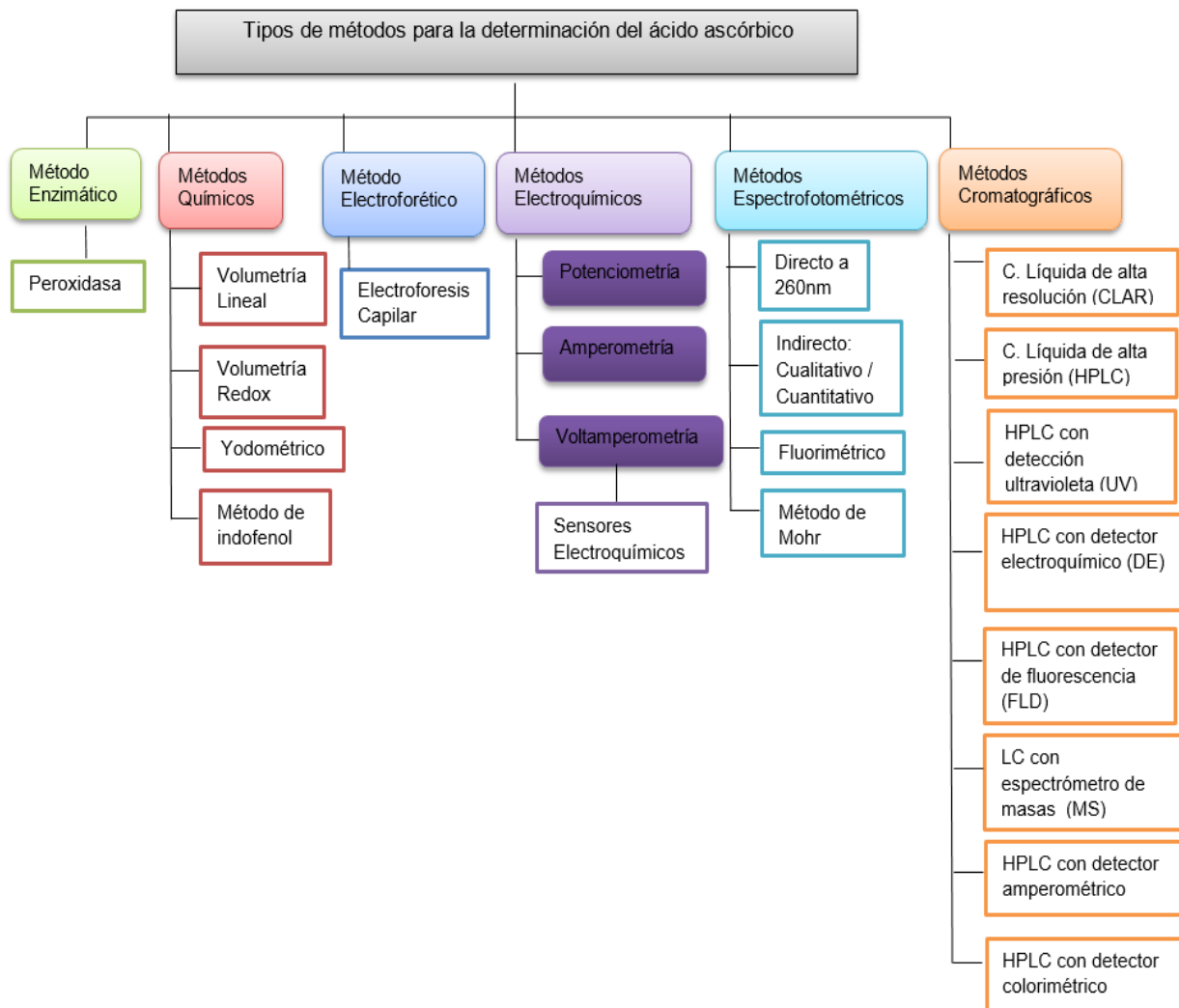


Figura 1. Tipos de métodos para la determinación del ácido ascórbico (Fang, 2016).