
Estudio de la capacidad reductora de antioxidantes naturales en medios modelo



Autora:

Blanca Moreno Gracia

Director:

Dr. Vicente Ferreira González

Departamento de Química Analítica

Grupo de investigación: **Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología (LAAE)**

Trabajo Fin de Grado en Química. Facultad de Ciencias Zaragoza. Curso 2015/2016.

RESUMEN

La comprensión de la base química de la reducción del vino despierta interés por su implicación en el desarrollo de importantes defectos sensoriales. Desde hace tiempo se conoce que cuando los vinos se almacenan en condiciones anóxicas, su potencial redox disminuye. Las causas de este fenómeno no se conocen, en parte por la dificultad asociada a la medición del potencial redox y por el escepticismo que su medida despierta. Dicha disminución implicaría que algunas especies presentes en el vino se oxiden de manera espontánea donando electrones al medio, quedando enriquecido en las formas reducidas de los pares redox presentes. La hipótesis de partida es que los polifenoles del vino podrían ser dichas especies donoras de electrones.

Este trabajo busca determinar el efecto de diversos parámetros de composición, la relación Fe(III)/Fe(II) sobre el potencial redox de vinos modelo medido con un electrodo de Pt y ver cómo afecta al proceso de reducción espontánea la presencia de determinados polifenoles.

Se ha desarrollado un riguroso procedimiento para la medición del potencial redox en condiciones de anoxia estricta que se ha aplicado a disoluciones conteniendo cantidades prefijadas de Fe(III) y Fe(II) y distintos contenidos de acomplejantes potenciales o de alcohol. Además, se ha implementado un método espectrofotométrico para determinar la proporción de Fe(III) presente en un vino blanco. Posteriormente, se ha empleado un vino modelo de composición específica para estudiar la reducción espontánea del Fe(III) en presencia o no de polifenoles.

Los resultados muestran la medida del potencial redox permitiendo seguir fielmente la evolución de la relación Fe(III)/Fe(II) de un vino sintético de composición determinada; el potencial redox asociado a una relación específica Fe(III)/Fe(II) influenciado por numerosos parámetros composicionales y que la reducción espontánea del Fe(III) tiene lugar incluso en ausencia de polifenoles. De hecho, algunos de ellos, parecen dificultarla.

ABSTRACT

The understanding of the processes behind the chemical reduction of wine are of interest for their relationship with the development of important sensory off-odors. The ability of wine to become reduced once it is stored in anoxic conditions has been known for some time. The causes of this phenomenon are however not known, partly because of the difficulties linked to the measurement of redox potential and partly because of the scepticism linked to its measurement. Decreasing redox potential implies that some species in wine spontaneously oxidize, donating electrons to the medium, becoming enriched in reduced forms of the different redox pairs. The starting hypothesis of this work is that wine polyphenols could be the species donating electrons.

The present work addresses the effects of different compositional parameters and of the Fe(III)/Fe(II) ratio on the redox potential of model wines, measured with a standard Pt electrode, and how spontaneous reduction of wine is affected by the presence of different polyphenols.

A rigorous procedure for the accurate measurement of redox potential in strict anoxia has been developed and applied to different wine models containing pre-established amounts of Fe(III)/Fe(II) and different levels of diverse iron-complexing agents and of ethanol. Besides, a spectrophotometric procedure able to determine the proportion of Fe(III) present in white wine has been implemented. Finally, a wine model with a specific composition has been used in order to study the spontaneous reduction of Fe(III) in presence or absence of polyphenols.

Results show that the measurement of redox potential allows to follow accurately the evolution of the Fe(III)/Fe(II) ratio of a specific wine; that the redox potential associated to such ratio is influenced by many other compositional factors, and that the spontaneous reduction of Fe(III) takes place even in absence of polyphenols. In fact, some of them may difficult it.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Objetivos y finalidad.....	5
3. Experimental.....	5
3.1 Instrumentación.....	5
3.2 Reactivos, patrones y material de referencia.....	7
3.3 Primera parte: Estudio del medio modelo de trabajo	9
3.4 Segunda parte: Estudio de la capacidad reductora de antioxidantes en vino sintético	12
3.5 Tercera parte: Estudio del comportamiento del Fe (III) en el vino sintético, en condiciones anóxicas con y sin la presencia de ácido gálico	16
4. Resultados y discusión.....	17
4.1 Estudio del medio modelo de trabajo	17
4.2 Estudio de la capacidad reductora de antioxidantes en vino sintético.....	20
4.3 Estudio del comportamiento del Fe (III) en el vino sintético, en condiciones anóxicas con y sin la presencia de ácido gálico	23
5. Conclusiones.....	24
6. Bibliografía.....	24

*“Usted no puede esperar construir un mundo mejor sin mejorar a las personas.
Cada uno de nosotros debe trabajar para su propia mejora”*

Marie Curie

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha hablado mucho sobre la importancia de conocer el potencial redox del vino para controlar de esta manera su almacenamiento y cuidado en la crianza¹⁻⁷. En 1962 se decidió expresar el estado de oxidorreducción de los vinos mediante la medida de su potencial redox. Fue la comisión de Enología, en el décimo Congreso Internacional de la OIV, en Tbilisi (Georgia), la encargada de ello⁸.

En el mundo del vino, el concepto vino reducido se emplea de manera indistinta para describir tanto aquellos vinos con un potencial redox bajo como para definir a los que presentan un defecto olfativo relacionado con la presencia de ácido sulfhídrico, mercaptanos y de otras sustancias azufradas.

En nuestro caso emplearemos el término en su sentido químico estricto, como proceso en el que una disolución se enriquece en las formas reducidas de los pares redox que contiene, con la consiguiente disminución del potencial redox. No olvidaremos, por otra parte, que los datos obtenidos en el LAAE han demostrado que la manifestación de problemas aromáticos denominados de reducción en los vinos son debidos al fenómeno de reducción que estos sufren.

En particular cuando determinados vinos se guardan en botellas con tapones estancos, se desarrollan aromas desagradables del grupo sulfhídrico (huevos podridos, suciedad...)¹ en el plazo de unos meses. Ernesto Franco Luesma, al estudiar en su tesis doctoral el potencial redox medido experimentalmente en vino, demostró que generalmente todos los vinos, cuando se almacenan sin oxígeno, tienden a reducir el potencial redox medido experimentalmente.

La determinación del potencial redox en vinos no es algo sencillo. Para su determinación se emplean dos electrodos, uno de medida, que generalmente es de platino, y otro de referencia, que suele ser de plata o de calomelanos. Debido a la cuestión relacionada con la contaminación por mercurio, hoy en día los electrodos saturados de calomelanos son menos comunes de lo que fueron antaño, aunque en ciertas aplicaciones son superiores a los electrodos de referencia Ag-AgCl⁹. El electrodo de referencia más ampliamente comercializado consiste en un electrodo de plata¹⁰ sumergido en una solución de cloruro potásico que se ha saturado con cloruro de plata. Estos electrodos tienen la ventaja de que pueden utilizarse a temperaturas superiores a 60°C mientras los electrodos de calomelanos no pueden.

Los electrodos, en contacto con el vino, terminan envenenándose. Esto produce interferencias en la medida obligando a una limpieza exhaustiva de los mismos. En general, el potencial deriva continuamente sin llegar a estabilizarse. Cuando sucede, es señal de que el electrodo podría haberse envenenado.

De acuerdo con las leyes de la termodinámica el potencial de oxidorreducción viene definido por la siguiente ecuación:

$$E = \frac{\Delta G}{n \cdot F}$$

Donde ΔG representa el incremento de la energía libre de Gibbs, n es el número de electrones que se intercambian y F es la constante de Faraday.

Las leyes de la termodinámica establecen que para que un proceso redox tenga lugar, tiene que haber una disminución del ΔG . Por tanto, en el caso de una reacción de oxidorreducción, su potencial tendrá que ser positivo y, cuanto más alto sea, mayor será la tendencia a que tenga lugar. Traduciendo este concepto a términos más sencillos y aplicables al mundo del vino, equivaldría a decir que cuanto mayor sea el potencial de un vino, mayor será su contenido en formas oxidadas. Asimismo, cuanto menor sea su potencial, mayor será su contenido en formas reducidas.

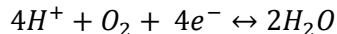
La ley de Nernst¹⁰ rige el potencial redox aplicado a una reacción de oxidorreducción. Su ecuación simplificada sería:

$$E = E^\circ - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[forma\ reducida]^b}{[forma\ oxidada]^a}$$

El vino no es una disolución sencilla, en él coexisten numerosas especies oxidorredutoras. Estandarizar matemáticamente en una fórmula el comportamiento del potencial del vino es sumamente complicado.

Para entender un poco más las medidas de potencial de los vinos, es necesario entender el comportamiento del potencial del agua, ya que esta es el componente mayoritario del vino.

La principal reacción redox que se produce en el agua es la siguiente¹¹⁻¹³:



La expresión de Nernst sería en esta ocasión:

$$E = E^\circ + \frac{RT}{4F} \ln \frac{[H^+]^4 [O_2]}{[H_2O]^2}$$

Considerando los siguientes datos para el agua destilada a 25°C:

$$E_o = 1177mV \quad [H_2O] = 55,55 \text{ mol} \cdot l^{-1} \quad F = 96500 \text{ C/mol}$$

$$R = 8,31 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot K^{-1} \quad pH = -\log[H^+]$$

Se obtiene la siguiente expresión final:

$$E(mV) = 1177 - 59,15 \text{ pH} + 14,79 \log[O_2]$$

El potencial del agua se ve en esta ecuación como depende del pH y de la concentración de oxígeno. Esto implica que para conocer el potencial redox, es preciso tanto conocer el pH como la concentración de oxígeno, o en su caso, trabajar en anoxia.

El vino es una matriz bastante más compleja que el agua porque en él se producen múltiples reacciones redox. Sin embargo, el potencial de este también se ve influenciado por el pH y la concentración de oxígeno presentes en él. En resumen, la ecuación que define el potencial de redox del vino se puede aproximar a la siguiente adaptación de la ecuación de Nernst:

$$E(mV) = E^\circ - 59,15 \text{ pH} + B \log[O_2] + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[forma\ químicas\ oxidadas]}{[forma\ químicas\ reducidas]}$$

En cuanto a los polifenoles, hay indicios que indican que los compuestos fenólicos de naturaleza muy reductora, pero con cinéticas naturales muy lentas, sean las especies que donen electrones al medio aunque se necesitan más datos experimentales e información para permitir constatar de manera fehaciente esos conocimientos.

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos se conoce y se estudia desde hace tiempo. Se define antioxidante¹⁴ como aquella sustancia que cuando está presente en concentraciones bajas, en comparación con las de un sustrato oxidable, retrasa significativamente o previene la oxidación de dicho sustrato.

Los flavonoides¹⁶ son la familia de compuestos polifenólicos más comunes. Estos suelen estar presentes en alimentos y bebidas como té, aceite de oliva y vino. Estas especies son muy interesantes de estudiar por la gran cantidad de actividades biológicas, fisiológicas y ecológicas que tienen. Se han realizado numerosos estudios para conocer las relaciones químicas y biológicas de estas especies que se encuentran en la naturaleza. Los flavonoides son polifenoles de bajo peso molecular que comparten una estructura común que se caracteriza por tener un esqueleto difenilpropano ($C_6C_3C_6$) basado en el núcleo flavonoide de 3 anillos. Los distintos grupos flavonoides se clasifican y diferencian por el grado de aromaticidad (dobles enlaces conjugados), la hidroxilación y el tipo de sustituciones (sulfatación, metilación, glicosilación, ...) y son antioxidantes en virtud del número y posición de sus grupos hidroxilo fenólicos unidos a las estructuras del anillo.

Los flavonoles, flavanoles y los antocianos en los vinos tintos son los flavonoides que se suelen encontrar con más frecuencia en los vinos. La quercitina (figura A) y la catequina serían, respectivamente, buenos ejemplos de ellos.

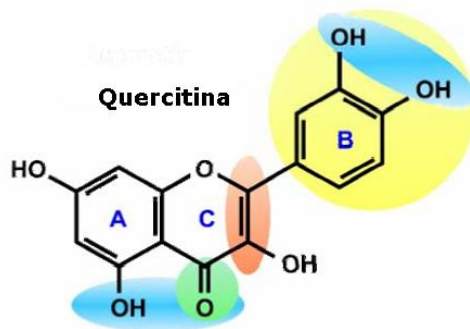


Fig A. Molécula de quercitina donde se distinguen los principales grupos de su estructura implicados en el potencial antioxidante. En el anillo B aparece marcado en amarillo el grupo catecol, en rojo se muestra el enlace insaturado del anillo C y en verde la función 4-oxo de la molécula, en azul se señalan los puntos de quelación de metales.

Existen diferentes ensayos que permiten medir la capacidad antioxidante en una muestra; el ensayo FRAP¹⁶⁻¹⁷ es uno de los más frecuentes. Se trata de un método simple y reproducible que puede aplicarse en el estudio de la eficiencia antioxidante de los antioxidantes con resultados comparables a aquellos obtenidos con otras metodologías más complejas. Se aplica tanto al estudio de la actividad antioxidante del plasma como al de los antioxidantes en muestras de comida y bebida¹⁸. Dicho ensayo, estudia la capacidad para

reducir el Fe(III) a Fe(II). En presencia de iones férricos y de TPTZ (2,4,6-tripiridil-triazina) lo que se hace en estos ensayos es incubar un volumen de muestra en un medio ácido cuyo pH es 3,6. De modo que la TPTZ forma complejos con ambas especies de Fe, formando un complejo de color azul intenso con el Fe (II).

Hace más de 60 años que se introdujo este reactivo químico¹⁹⁻²⁰. La reducción del Fe(III) que se produce al realizar este ensayo ocurre a un potencial más bajo, debido a que el Fe(II) está fuertemente acomplexado. El ensayo FRAP además permite conocer la cantidad de Fe total de las muestras.

Otro ensayo que se desarrolló hace algún tiempo, es el que emplea el ácido 5-sulfosalicílico²¹⁻²² como reactivo colorimétrico formando un complejo amarillo que permite la determinación casi simultánea del Fe(III) y del Fe total de una muestra.

Recientemente Danilewicz²³ ha presentado un ensayo que permite medir de forma directa el Fe(II) presente en el vino. El ferrocino forma con el Fe(II) un complejo de color magenta que presenta una banda de absorción intensa a 562nm. Dicho ensayo se adecúa a nuestros intereses.

Este mismo autor, Danilewicz²³, ha afirmado recientemente que la medición del potencial en el vino no tiene ningún uso práctico para definir el estado redox del vino. Dicha afirmación viene ligada, tanto a la observación de que muchos investigadores realizan la medida en presencia de O₂, como al hecho de que el potencial redox de cada vino depende no sólo de su relación Fe(III)/Fe(II) sino de muchos otros parámetros composicionales.

Sin embargo, el potencial redox bien determinado es imprescindible para determinar el estado redox de los vinos y para estudiar su evolución durante el almacenamiento en sistemas con diversa entrada de O₂.

El fenómeno de oxidación espontánea que se pretende estudiar en este trabajo es novedoso ya que no ha sido descrito en la literatura hasta el momento. Dicho proceso no está favorecido termodinámicamente. El potencial redox del sistema Fe(III)/Fe(II) en el vino está situado alrededor de 345mV (frente a SHE). Sin embargo, los potenciales de los polifenoles más reductores que se registran en otros estudios al pH del vino se encuentran por encima de 500mV. Estos potenciales corresponden a reacciones puras, pero las quinonas²⁴ son las que pueden sufrir otras reacciones con distintos nucleófilos.

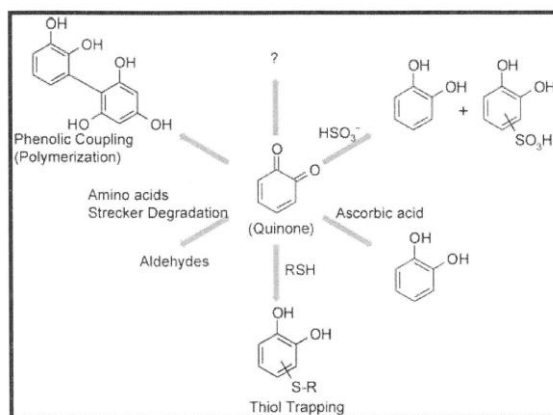


Fig B. Hipótesis estructural de productos de reacción entre 4-metil-1,2-benzoquinona y nucleófilos del vino.

2. OBJETIVOS Y FINALIDAD

La finalidad última del trabajo es contribuir a la comprensión de los procesos químicos relacionados con la reducción espontánea del vino. Los objetivos específicos del trabajo son:

1. Establecer el efecto de diversos parámetros de composición y de la relación Fe(III)/Fe(II) sobre el potencial redox de vinos modelo.
2. Verificar que la medida del potencial redox ofrece una estimación realista de la relación Fe(III)/Fe(II) en un vino modelo.
3. Verificar si en el proceso de reducción espontánea de los vinos, los polifenoles juegan un papel esencial.

Para lograr estos objetivos, es necesario afrontar otros más específicos en lo que concierne al trabajo en el laboratorio:

- Aprender a manejar la cámara de guantes con total autonomía, a preparar disoluciones en su interior y a realizar la medición del potencial redox de varias disoluciones.
- Preparar diversos vinos modelo dentro de la cámara anóxica con diversas relaciones de Fe^{2+} y Fe^{3+} y diversos contenidos en acomplejantes, concentración total de Fe y de alcohol, midiendo de manera rigurosa su potencial redox.
- Preparar dentro de la cámara de guantes disoluciones que contengan Fe^{3+} y distintos polifenoles como ácido gálico, pirogalol, catecol, quercetina, ácido cafeico y catequina. Incubar las muestras durante una y dos semanas en la estufa y medir el potencial redox.
- Adaptar el ensayo propuesto por Danilewicz²³ a las muestras preparadas para medir directamente sobre estas el Fe (II) y el Fe total presente en el medio modelo por reacción con ferrocino.
- Aprender a manejar el espectrofotómetro de absorción Vis-UV del laboratorio. Introduciendo las muestras en el espectrofotómetro de forma manual, utilizando cubetas de cuarzo y manejando el software del instrumento para extraer la información analítica de interés.

3. EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentación

a) Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible Shimadzu modelo UV-1700.

Todas las medidas de absorbancias que se han llevado a cabo durante el procedimiento experimental se han realizado con el Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible Shimadzu modelo UV-1700. Este instrumento posee una amplia gama de funciones analíticas para que las medidas sean rápidas y fáciles. Incluye funciones de validación integrales y cuenta con una resolución de 1nm. Es un espectrofotómetro con capacidad integrada para fotometrías, cinética, análisis, cuantificación y validación. Todas estas características le confieren robustez y un manejo sencillo. Este modelo UV-1700 puede operar de forma independiente o controlado por un ordenador.



Fig 1. A la izquierda aparece el Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible Shimadzu modelo UV-1700 empleado en el laboratorio. A la derecha una cubeta de cuarzo con la muestra de análisis.

Las medidas realizadas durante el estudio se han realizado con 2 de los modos que incluyen este espectrofotómetro²⁵⁻²⁶: el modo continuo y el modo de escaneo durante un tiempo fijado. La introducción de los parámetros característicos para este procedimiento experimental se hizo de forma manual, modificándolos sobre la pantalla del equipo, con las teclas que tiene el instrumento. La mayoría de las veces no era necesario modificar demasiados parámetros ya que, la longitud de onda se mantenía fija en 562nm, longitud a la que absorbe el complejo formado por el Fe (II) con el ferrocino y objeto de estudio en este trabajo. Las cubetas que se emplean para las medidas de absorbancia son de cuarzo, material que permite hacer un barrido a todo el espectro Vis-UV, cuya anchura son de 1cm. Antes de realizar cualquier tanda de medidas se hace un autocero para poner a punto el espectrofotómetro.

b) Medidor portátil JENCO 6230N pH, potencial redox y temperatura.

Las medidas del potencial redox en el interior de la cámara de guantes se han realizado con el medidor portátil JENCO 6230N²⁷. Este instrumento consta de un microprocesador incorporado que calcula y compensa todos los parámetros relevantes en relación con el pH. El medidor puede emplear el electrodo de pH, el electrodo de ORP y el ATC (Compensación Automática de Temperatura). Consume poca energía, tiene un alto rechazo de ruido de 50/60 Hz AC y su manejo es sencillo.

Pantalla	RANGO	EXACTITUD	RESOLUCIÓN
pH	-2,00 hasta 16 pH	±0,01 pH	0,01 pH
mV	-1999 hasta +1999mV	±0,05% FS	1 mV
Temperatura	-10 hasta 120 °C	±0,3 °C	0,1°C

Tabla 1. Especificaciones medidor portátil JENCO 6230N



Fig 2. Medidor portátil JENCO 6230N

El medidor se usa durante toda la parte experimental con un electrodo indicador de Pt y un sistema de referencia Ag/AgCl. El modo que se selecciona para medir el potencial redox es

el cuatro, ya que este permite registrar las medidas de potencial en la pantalla y también la temperatura. El medidor se calibra antes de las medidas con un patron redox 220mV (25°C)

c) Cámara de guantes JACOMEX.

La cámara de guantes Jacomex²⁸ es un aparato que permite trabajar en un entorno con muy bajo contenido de oxígeno y humedad. La cámara consta de unas unidades de purificación que son capaces de filtrar el aire e introducir un gas inerte, concretamente Ar, para conseguir con ello una atmósfera libre de oxígeno en la que trabajar de forma segura.

Los experimentos que se llevan a cabo durante el trabajo requieren del empleo de dicha cámara de guantes para la preparación de todas las muestras. Ya que el objetivo principal que se persigue es ver cómo se comporta el Fe (III) en un medio, vino sintético, cuando se tiene ausencia total de oxígeno (anoxia).



Fig 3. En la foto de la izquierda se muestra la cámara de guantes Jacomex empleada en el laboratorio. En la foto de la derecha se muestra el modo de operación con los guantes para la preparación de muestras.

Para el correcto uso de la cámara se fija en 300 ppm de O₂ el nivel máximo de trabajo. Se siguen una serie de recomendaciones generales antes de operar cada día con la cámara.

El material necesario para cada día de trabajo se introduce en la precámara siempre con la puerta interior cerrada. Es importante introducir todo el material abierto (botes, viales, matraces) ya que se podría introducir O₂ dentro de la cámara y los niveles de concentración de oxígeno que suelen estar estables en ≤ 5 ppm variarían. Este aparato consta de dos precámaras, una grande y una más pequeña, en la que cuesta menos hacer los ciclos. Una vez se introduce el material de trabajo, se cierra bien la puerta exterior de la precámara y se enciende la bomba de vacío. Se requiere hacer 3 ciclos antes de abrir la puerta interior de la precámara.

3.2 Reactivos, patrones y material de referencia.

Para la preparación de todas las disoluciones que se detallan en el punto 3.3 se utiliza como disolvente agua Milli-Q.

Los reactivos²⁹ empleados para preparar las diferentes muestras de análisis para la elección del medio modelo de trabajo son los siguientes:

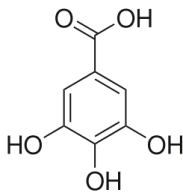
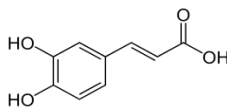
Nombre del reactivo	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	Pureza	Casa comercial	CAS
Cloruro de hierro (II) tetrahidratado	Cl ₂ FeH ₈ O ₄	198,81	≥ 99%	Sigma Aldrich	13478-10-9
Cloruro de hierro (III) hexahidratado	Cl ₃ FeH ₁₂ O ₆	270,30	98-102%	Sigma Aldrich	10025-77-1
Ácido L- tartárico	C ₄ H ₆ O ₆	150,09	99%	Panreac	87-69-4
Ácido cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	192,12	≥99,5%	Sigma Aldrich	77-92-9
Ácido glutámico	C ₅ H ₉ NO ₄	147,13	99%	Sigma Aldrich	56-86-0
Etanol	C ₂ H ₆ O	46,07	99,9%	Sigma Aldrich	64-17-5

Tabla 2. Reactivos empleados en el laboratorio para la preparación de las disoluciones de la primera parte experimental.

Para la calibración del medidor de potencial redox se emplea un patrón redox³⁰ 220 mV (25°C) RS, compuesto por una mezcla de sales de hierro y tampón de pH 7. Este producto es suministrado por Crison y tiene una densidad de 1,004kg/L. El potencial redox que se mide con esta disolución puede variar en función de la temperatura a la que se realice la medida como pone de manifiesto la tabla I (*ver anexo I*). La tolerancia es de ±10 mV.

Durante el procedimiento experimental las medidas de potencial para la calibración se registraron a las temperaturas de laboratorio (17-23°C) y fueron desde 230-248mV.

En la 2ª y 3ª parte experimental se emplearon los reactivos que se recogen en la tabla 4 que muestra las características específicas de los 6 polifenoles que se utilizaron durante el estudio de la capacidad reductora de antioxidantes en un medio modelo.

Nombre del reactivo	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	Pureza (%)	Casa comercial	CAS
Ácido gálico 	C ₇ H ₆ O ₅	170,12	97,5-102,5	Sigma Aldrich	149-91-7
Ácido cafeico 	C ₉ H ₈ O ₄	180,20	98	Sigma Aldrich	331-39-5

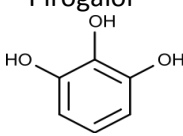
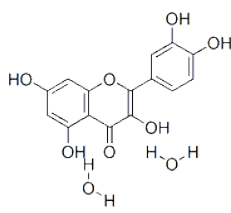
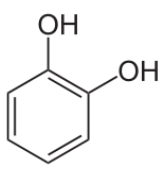
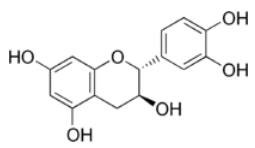
Pirogalol 	$C_6H_6O_3$	126,11	98	Sigma Aldrich	87-66-1
Quercetina dihidratada 	$C_{15}H_{10}O_7$	338,30	$\geq 95\%$	Sigma Aldrich	117-39-5
Catecol 	$C_6H_6O_2$	110,11	98	-	120-80-9
Catequina hidratada 	$C_{15}H_{14}O_6$	290,27	97	Sigma Aldrich	225937-10-0
4- [3-piridin-2-il-6- (4-sulfofenil) -1,2,4-triazol-5-il] benceno sulfonato de sodio, conocido también como ferrocino	$C_{20}H_{13}N_4NaO_6S_2$	492,46	≥ 97	Sigma Aldrich	69898-45-9
Ácido L-ascórbico	$C_6H_8O_6$	126,13	99	Panreac	50-81-7
Sulfato de cobre pentahidratado	$CuH_{10}O_9S$	249,68	98	Sigma Aldrich	7758-99-8

Tabla 3. Reactivos empleados en el laboratorio para la preparación de las disoluciones de la segunda y tercera parte experimental.

3.3 Primera parte: estudio del medio modelo de trabajo.

En la primera parte experimental del trabajo se estudian vinos sintéticos de distinta composición a fin de estudiar el efecto de polifenoles, alcohol y varios ácidos orgánicos sobre el potencial redox de muestras conteniendo diferentes proporciones de Fe (II) y Fe (III).

a) Preparación vino sintético

Las ocho clases de vinos sintéticos que se prepararon en el laboratorio se elaboraron de forma parecida, en fechas distintas, y teniendo en cuenta, en cada uno de ellos, que los reactivos que se añaden para prepararlos varían con el grado alcohólico (tabla 4).

Procedimiento experimental: en primer lugar, se dispone de todo el material de laboratorio necesario (vaso de precipitados de 500mL, matraz aforado clase A de 500mL, núcleo magnético, cuentagotas, agua Milli-Q, probeta 100mL, espátula).

Seguidamente, se pesan en el granatario los reactivos necesarios para la preparación de los vinos sintéticos (tabla 4) y se disuelven con agua Milli-Q. Además, se añaden 60 o 70mL de EtOH, según el grado alcohólico sea 12% o 14%, respectivamente. Con ayuda del agitador magnético, se mezcla y disuelve el vino sintético que se está preparando. Después, el contenido del vaso se transfiere al matraz de 500mL, y se añade agua Milli-Q hasta el cuello del matraz aforado de 500mL. Para ajustar el pH se vierte el contenido del matraz en el vaso de 500mL y se mide con el pH-metro calibrado. Para conseguir un pH=3,5 se añade con un cuentagotas NaOH 4M. Tras ajustar el pH, se transfiere la disolución al matraz de 500mL y se enrasa con agua Milli-Q. Una vez enrasado, se pasa el contenido del matraz a una botella de cristal de 500mL perfectamente etiquetada con el nombre de la persona que lo ha preparado y la fecha de preparación. Los diferentes vinos sintéticos se guardan en la nevera hasta su uso para la preparación de las disoluciones madre y las muestras a estudiar.

Orden preparación	Componentes variables del vino sintético								Grado alcohólico (%)
	Ácido tartárico		Ácido cítrico		Ácido glutámico		Ácido gálico		
	Masa (g)	[C] (g/L)	Masa (g)	[C] (g/L)	Masa (g)	[C] (g/L)	Masa (g)	[C] (g/L)	
1º	2,5	5,0	-	-	-	-	-	-	12%
2º	2,5	5,0	-	-	-	-	-	-	14%
3º	2,5	5,0	1,0	2,0	-	-	-	-	12%
4º	2,5	5,0	1,0	2,0	-	-	-	-	14%
5º	2,5	5,0	-	-	0,50	1,0	-	-	14%
6º	2,5	5,0	-	-	-	-	1,0	2,0	14%
7º	2,5	5,0	1,0	2,0	0,50	1,0	-	-	14%
8º	2,5	5,0	-	-	-	-	-	-	14%
9º	2,5	5,0	-	-	-	-	-	-	14%

Tabla 4. Datos para la preparación de los nueve vinos sintéticos estudiados con diferentes componentes y grados alcohólicos.

a) Preparación disoluciones madre de $\text{Cl}_2\text{Fe}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Cl}_3\text{Fe}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Los ensayos y las medidas del potencial redox de las muestras se hicieron en días diferentes dentro de la cámara anóxica. Para todos los experimentos se prepararon cada día las disoluciones madre de $\text{Cl}_2\text{Fe}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Cl}_3\text{Fe}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Estas disoluciones se preparan en 100mL, con una concentración 2mM para los 8 primeros experimentos y 1mM para los 2 últimos.

Para preparar las disoluciones 2mM se pesan en la balanza analítica situada, dentro de la cámara anóxica, aproximadamente 0,0397g de $\text{Cl}_2\text{Fe}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, para que la concentración sea la requerida y 0,0541g de $\text{Cl}_3\text{Fe}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Esta masa se disuelve con el vino sintético que corresponda según el número de ensayo y que, previamente, se ha preparado e introducido en la cámara.

Para preparar las disoluciones 1mM se pesan igualmente 0,0199g de $\text{Cl}_2\text{Fe}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 0,0274 g de $\text{Cl}_3\text{Fe}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$.



Fig 3. Parte del material necesario dentro de la cámara anóxica para la preparación de las disoluciones madres de $\text{Cl}_2\text{Fe}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Cl}_3\text{Fe}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

b) Preparación de las muestras de ensayo para la primera parte experimental

Las muestras 0,5mM se preparan diluyendo dos volúmenes (sumando en total 5mL) de las disoluciones madre 2mM de $\text{Cl}_2\text{Fe}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Cl}_3\text{Fe}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en un volumen de 20mL. Los volúmenes se escogen para tener la proporción Fe(III)/Fe(II) deseada.

Posteriormente se enrasa el matraz de 20mL con el vino sintético correspondiente.

DISOLUCIONES	Volumen Fe^{2+} (mL)	Volumen Fe^{3+} (mL)
Fe^{2+} 1/99 Fe^{3+}	0,05	4,95
Fe^{2+} 10/90 Fe^{3+}	0,50	4,50
Fe^{2+} 50/50 Fe^{3+}	2,50	2,50
Fe^{2+} 90/10 Fe^{3+}	4,50	0,50
Fe^{2+} 99/1 Fe^{3+}	4,95	0,05

Tabla 5. Volúmenes de adición de Fe^{2+} y Fe^{3+} sobre las muestras cuya concentración de Fe total debe ser 0,5mM.

Una vez se preparan todos los matraces con las disoluciones con distinta proporción Fe(III)/Fe(II) , se trasvasan los contenidos a viales perfectamente etiquetados de 24mL. En dichos viales se introduce el electrodo y se mide durante 5 minutos, que es el tiempo aproximado que tarda la medida en estabilizarse. Previamente, el medidor de potencial redox se calibra con la disolución redox 220V (25°C) y entre medida y medida, el electrodo se lava con agua destilada y se seca con mucho cuidado con papel.

Las disoluciones conteniendo una concentración total de Fe de 0,1mM se preparan de manera equivalente con un volumen total de Fe de 2mL.

DISOLUCIONES	Volumen Fe^{2+} (mL)	Volumen Fe^{3+} (mL)
Fe^{2+} 1/99 Fe^{3+}	0,02=20 μL	1,98
Fe^{2+} 10/90 Fe^{3+}	0,20=200 μL	1,80
Fe^{2+} 50/50 Fe^{3+}	1,00=1000 μL	1,00=1000 μL
Fe^{2+} 90/10 Fe^{3+}	1,80	0,20=200 μL
Fe^{2+} 99/1 Fe^{3+}	1,98	0,02= 20 μL

Tabla 6. Volúmenes de adición de Fe^{2+} y Fe^{3+} sobre las muestras cuya concentración de Fe total debe ser 0,1mM.



Fig 4. Preparación de las muestras con diferentes proporciones de Fe^{2+} y Fe^{3+} y posterior medida del potencial redox.

3.4 Segunda parte: estudio de la capacidad reductora de antioxidantes en vino sintético

La segunda parte del procedimiento experimental requiere la preparación de vino sintético con 5g/L ácido tartárico y 14% EtOH; muestras con los distintos polifenoles a estudiar, así como la construcción de la recta de calibrado para poder interpolar en ella los resultados de las medidas de absorbancia de las muestras a fin de determinar la concentración de Fe (II) y Fe total al finalizar el experimento.

a) Preparación vino sintético

El procedimiento para preparar el vino sintético es el mismo que el expuesto anteriormente con la salvedad, de que en esta ocasión, se disponen 2L a fin de preparar las disoluciones de la recta de calibrado y otros 2L para las muestras que contendrán los polifenoles. En esta ocasión, se pesan en el granatario 10,0 g de ácido tartárico y se añaden 280 mL de etanol. El pH se ajusta a 3,50 añadiendo unas pocas gotas de NaOH 4M.

b) Preparación recta de calibrado

Se requiere un volumen de 2L de vino sintético al cual se le añaden 126,3 mg de ácido áscorbico (0,063 g/L) y se ajusta su pH a 3,50.

Para la construcción de la recta de calibrado son necesarias varias disoluciones (ver tabla II y figura A del anexo I).

- **Disolución de ferrocino 35g/L V=10mL**

Se pesan en la balanza analítica 0,3502g de ferrocino en un vial de 10 mL; se disuelven con agua Milli-Q y se trasvasan cuantitativamente a un matraz de 10 mL. Tras el enrase la disolución se guarda en otro vial de 10mL.

- **Disolución madre de $\text{Cl}_2\text{Fe}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 250mg/L V=250mL**

Se pesan en la balanza analítica 0,2225g de $\text{Cl}_2\text{Fe}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$; se disuelven en vino sintético y se trasfiere la disolución a un matraz de 250mL.

- **Disoluciones diluidas de Fe (II)**

Se preparan diferentes disoluciones en matraces de 100 mL para cubrir el rango de concentración de Fe (II) desde 0 a 4mg/L. Los volúmenes que se toman de Fe (II) son los que se registran en la tabla 7.

[Fe ²⁺] (mg/L)	Volumen(mL)
0,000	0,00 = 0 μL
0,500	0,20 = 200 μL
1,00	0,40 = 400 μL
1,50	0,60 = 600 μL
2,00	0,80 = 800 μL
2,50	1,00 = 1000 μL
3,00	1,20 = 1200 μL
3,50	1,40 = 1400 μL
4,00	1,60 = 1600 μL

Tabla 7. Volúmenes de adición de disolución madre $\text{Cl}_2\text{Fe}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 250mg/L para la preparación de los diferentes puntos de la recta de calibrado.

Para la medición de la absorbancia de cada una de las disoluciones del rango establecido se preparan varios matraces de 5mL perfectamente etiquetados con cada uno de los puntos de la recta de calibrado. Seguidamente, antes de llevar a cabo la medida de absorbancia se añaden 25 μL de la disolución de ferrocino con una micropipeta 0-100 μL . Se observa un cambio casi instantáneo en la coloración de la disolución que adquiere un tono magenta consecuencia del complejo formado. La disolución lista para analizar se mezcla rápidamente y parte de ella se usa para homogeneizar la cubeta que seguidamente se rellena y se coloca en el espectrofotómetro para registrar la medida.

Las medidas de absorbancia se llevan a cabo con el espectrofotómetro VIS-UV en modo de medida continuo, a una longitud de onda $\lambda=562\text{nm}$ y tras hacer un autocero con agua Milli-Q en ambas cubetas de cuarzo. El dato de absorbancia que se registra para cada una de las disoluciones se emplea para construir la recta de calibrado.

c) Preparación general de muestras con los distintos polifenoles

Las 24 muestras se preparan en diferentes días. Para cada uno de los polifenoles estudiados se preparan 4 *wine-in-tube* de 60 mL (los WIT son unos tubos de cristal de alta calidad que cierran de manera muy hermética con cierres tipo screw-cap) a partir del vino

sintético preparado como se detalló anteriormente. Para cada polifenol se preparan en el interior de la misma matraces de 250 mL que contienen los gramos necesarios de cada polifenol para que la concentración de estos sea 0,5mM (tabla 8), el volumen necesario de la disolución madre de $\text{Cl}_3\text{Fe}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ para que la concentración de Fe^{3+} sea 0,1mM y 62 μL de disolución madre de $\text{Cu}_2\text{SO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ para tener una concentración 0,1 ppm de Cu^{2+} .

	Masa real pesada (g)	Concentración real (mM)
Ácido gálico	0,0212	0,499
Ácido cafeico	0,0224	0,497
Pirogalol	0,0158	0,501
Catequina hidratada	0,0138	0,501
Catecol	0,0363	0,500
Quercetina dihidratada	0,0378	0,447

Tabla 8. Masas y concentraciones reales de cada polifenol añadidas a las muestras que se preparan durante la 2ª parte del procedimiento experimental.

Los 4 tubos de cada polifenol se prepararon en diferentes días siguiendo el mismo procedimiento: ajuste a 3,5 del pH vino sintético, borboteo del vino con N_2 , introducción del material necesario dentro de la cámara, adición del polifenol y el resto de reactivos al matraz de 250mL y enrase con vino sintético.

Una vez preparados los 24 *wine-tube*, y cerrados bien con el tape de rosca, se embolsan 2 veces. En el primer envasado se añaden a la bolsa de plástico 15mL de polvo de carbón activo con ácido ascórbico para asegurar la eliminación del poco oxígeno que pudiera permear. Seguidamente, se dobla la bolsa evitando que se derramen los polvos y se hace vacío 3 veces con la envasadora y después se pulsa la tecla de sellado. La bolsa así preparada se embolsa y sella hermética y anóxicamente en una segunda bolsa que es etiquetada con rotulador permanente. Una vez envasados todos los tubos se sacan de la cámara de guantes y se ponen a incubar en la estufa a 50°C durante una semana una mitad y dos semanas otra.

Tras el periodo de incubación, se procede al análisis de las muestras de cada polifenol. Para ello se trasvasa el contenido de los *wine-tube* a viales de 24 mL etiquetados. Los viales se sacan de la cámara para la medición espectrofotométrica. El espectrofotómetro se dispone para realizar una medición continua de la absorbancia a 562 nm durante 10 minutos. Para la medición se transfieren 10 mL del tubo conteniendo la muestra a un vial, y se añaden 50 μL de la disolución de ferrocino. Nada más añadir el ferrocino, se pulsa la tecla START del espectrofotómetro, se agita el vial y rápidamente se homogeneiza la cubeta y se vierte la cantidad necesaria para medir la absorbancia durante los 10 minutos. Para conocer la cantidad de Fe total de la muestra se vierten 5mL de la muestra en un vial y se les añade 25 μL de ácido ascórbico. Tras esperar 30 minutos, para que se complete la reacción, se mide la absorbancia.

- **Preparación disoluciones madre $\text{Cl}_3\text{Fe}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$**

La segunda parte experimental requiere la preparación de nuevas disoluciones madre de $\text{Cl}_3\text{Fe}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Como los experimentos se realizan en días diferentes, se preparan de igual modo que en la primera parte experimental, dos nuevas disoluciones madre de $\text{Cl}_3\text{Fe}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ de concentraciones 1mM y 10mM. Con los polifenoles ácido gálico, ácido cafeico y pirogalol se

utiliza la disolución madre de Fe(III) 1,01 mM. Para prepararla, se pesan exactamente 0,0273g en la balanza analítica y se disuelven con el vino sintético previamente preparado y borboteado con nitrógeno, hasta enrasar el matraz de 100mL y conocer la concentración exacta de Fe (III) de la disolución 56,4 mg/L. Una vez preparada la disolución, se transfiere a un vaso de plástico de 100mL donde se guarda hasta su posterior uso. Se añade la cantidad necesaria de disolución madre al matraz de 250 mL para que la concentración final de Fe sea 0,1mM.

- **Preparación disolución madre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$**

La disolución madre de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, conteniendo 403,1 mg/L ya se encontraba preparada al ser de uso común. De esta disolución se añade el volumen adecuado (62µL) para que la concentración de Cu(II) en las muestras sea de 0,1 ppm.

- **Preparación disoluciones de ferrocino**

Durante la segunda parte experimental se preparan 4 disoluciones diferentes de ferrocino siguiendo el mismo procedimiento. La primera se prepara para construir la recta de calibrado, pesando 0,3505g en la balanza analítica en un vial de 10mL y disolviéndolos con agua Milli-Q (35,0 g/L de concentración final). Para preparar las otras 3 disoluciones que se necesitan se pesan los gramos de ferrocino que se indican en la tabla 9 y posteriormente se disuelven con agua Milli-Q enrasando el matraz de 10 mL ó 5 mL (tabla 9) y se transfiere la disolución a un vial de 10 mL perfectamente etiquetado; 50 µL, de esa disolución se toman con una micropipeta de 0-100 µL y se añaden sobre las muestras o calibrados.

Fecha de preparación	12/04/16	19/04/16	26/04/16
Tipo de muestra	<i>Ác. Galico y Ác. Cafeico</i>	<i>Pirogalol, Catequina, Catecol</i>	<i>Quercetina y repetición de una de las replicas diluida 1:2</i>
Volumen matraz	10	5	5
Masa ferrocino (mg)	350,5	175	175,0
Concentración ferrocino (mg/L)	35050	35000	35000

Tabla 9. Datos para la preparación de la disolución de ferrocino en diferentes fechas.

- **Preparación disoluciones de ácido ascórbico**

Las disoluciones de ácido ascórbico se necesitan para conocer la concentración exacta de Fe total que hay en cada una de las muestras.

Se preparan 6 disoluciones diferentes de ácido ascórbico (tabla 10) durante el periodo de tiempo que dura la segunda parte del estudio experimental. El procedimiento a seguir es el mismo, pesando primero los gramos de ácido ascórbico (tabla 10) y seguidamente se disuelven con el vino sintético preparado para esta segunda etapa experimental. Después se enrasa el matraz de 10mL; 25 µL de esta disolución se añaden sobre la muestra conteniendo el ferrocino.

Fecha preparación	12/04/16	13/04/16	19/04/16	20/04/16	21/04/16	26/04/16
<i>Tipo de Muestra</i>	<i>Ácido Gálico</i>	<i>Ácido Cafeico</i>	<i>Pirogalol</i>	<i>Catequina</i>	<i>Catecol</i>	<i>Quercetina y repetición réplica diluida 1:2</i>
Volumen matraz (mL)	10	10	100	10	10	10
Masa Ác. Ascórbico (mg)	126,0	126,0	1264,2	126,1	126,0	126,1
Concentración Ác. Ascórbico (mg/L)	12600	12600	12642	12610	12600	12610

Tabla 10. Datos para la preparación de la disolución de ácido ascórbico en diferentes fechas.

3.5 Tercera parte: estudio del comportamiento del Fe (III) en el vino sintético, en condiciones anóxicas con y sin la presencia de ácido gálico

Tras analizar los resultados del segundo procedimiento experimental se decide concluir la parte experimental del trabajo comprobando lo que le ocurre al Fe(III) en condiciones anóxicas en presencia o no de ácido. Tras preparar las muestras dentro de la cámara de guantes, se transfieren a viales de 24mL y se sacan para analizarlas en el espectrofotómetro Vis-UV igual que se hacía con las muestras de la segunda parte experimental.

a) Preparación vino sintético

Se preparan 2L del mismo modo que en los anteriores apartados.

b) Preparación disoluciones de $\text{Cl}_3\text{Fe}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ con distintas concentraciones

Se prepara, en primer lugar, una disolución madre de 1000mg/L, para ello se pesan en la balanza analítica 0,4840g y se disuelven con vino sintético. El resto de disoluciones se preparan en matraces de 200mL siendo las concentraciones de las mismas 10, 30 y 100mg/L de manera que se añaden 2,6 y 20mL respectivamente para prepararlas.

c) Preparación disoluciones de $\text{Cl}_3\text{Fe}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ con ácido gálico

En un volumen de 700mL de vino sintético se añaden 0,0595g de ácido gálico. Seguidamente se preparan en matraces de 200mL tres disoluciones con una concentración 10, 30 y 100 mg/L de Fe (III) y 0,500 mM de ácido gálico.

El tratamiento de todos los resultados obtenidos durante la parte experimental del trabajo se hace con la herramienta estadística Excel y con ella se procesan todos los datos que aparecen a continuación y se construyen las tablas y gráficas a discutir.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados del estudio del medio modelo de trabajo

Durante la primera parte experimental se registran los datos de potencial obtenidos para muestras preparadas con diferentes proporciones de Fe(II) y Fe(III) en distintos tipos vino modelo.

Se comienzan los experimentos con la preparación de dos vinos sintéticos con el mismo ácido tartárico y pH pero difiriendo en el grado alcohólico (12% y 14%, respectivamente). Los potenciales que se obtienen son los registrados en la tabla 11.

Se observa que el potencial en ambos casos va disminuyendo conforme la relación logarítmica ($\log [Fe^{2+}] / [Fe^{3+}]$) es más positiva, es decir, cuanto mayor es la $[Fe^{3+}]$ en la muestra mayores son los potenciales registrados. Pero en el caso del vino sintético del 14% EtOH se ve como el salto de potencial entre las muestras con distintas proporciones de Fe es más grande, comprobándose de esta forma cómo el grado alcohólico influye en el potencial que se registra en los vinos. Además, la curva del vino sintético del 12% EtOH está algo tumbada y el primer punto (203 mV) es algo extraño en comparación con el resto de puntos, esto podría deberse a la imprecisión en la preparación de la muestra.

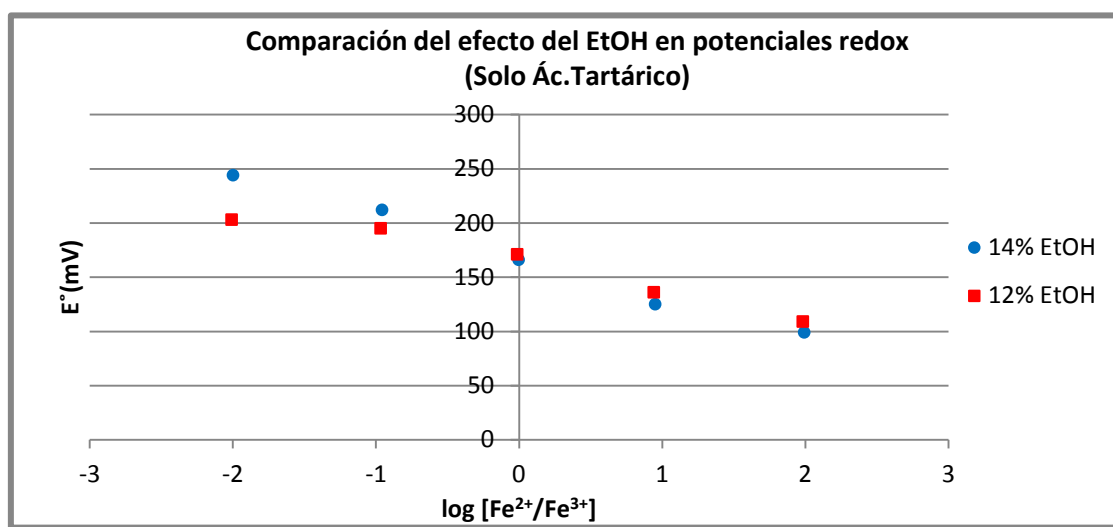


Fig 5. Representación gráfica que compara el E° vs $\log [Fe^{2+}/Fe^{3+}]$ para los vinos sintéticos con ácido tartárico y un 12% o 14% EtOH.

Tras comprobar que el grado alcohólico desempeña un papel importante en las medidas de potencial de los vinos, se continúan los experimentos manteniendo constante el grado alcohólico del vino en 14% y modificando los acomplejantes para ver cómo influyen en el potencial redox. En la figura 6, se representa el potencial (mV) frente a la relación logarítmica entre las concentraciones de Fe(II) y Fe(III) para los vinos sintéticos preparados con distintos acomplejantes. Puede verse como todos los potenciales disminuyen en función de la proporción de Fe(II) y Fe(III) que contienen. El vino sintético preparado con 3 acomplejantes: ácido cítrico, ácido tartárico y ácido glutámico proporciona una curva más suave y la medida de potencial más baja registrada durante esta parte experimental (53mV). Quizás esta, de

todas las curvas obtenidas, sería la que más se asemejaría a la de un vino blanco. Sin embargo, el salto más grande que se produce entre los potenciales se aprecia en el vino sintético que solo contiene ácido tartárico y un grado alcohólico del 14%.

Cuanto más bajos son los potenciales de partida del Fe(III) más complicado será el estudio de la capacidad reductora de antioxidantes en medios modelo, por lo que nos interesa elegir un vino sintético en el que el salto de potencial sea grande y no muy bajo. El vino sintético que mejor cumplía estos requisitos, era el preparado añadiendo solo ácido tartárico 5g/L con un grado alcohólico del 14%.

Grado alcohólico	12%	14%	12%	14%	14%	14%	14%
Temperatura (°C)	22	19	23	19	19	17	17
E° (mV) dis.calibrado	230	244	234	248	243	248	248
Vino sintético	Tartárico	Tartárico	Tartárico + Cítrico	Tartárico + Cítrico	Tartárico + Glutámico	Tartárico + Gálico	Tartárico + Cítrico+ Glutámico
DISOLUCIONES	E° (mV)	E° (mV)	E° (mV)	E° (mV)	E° (mV)	E° (mV)	E° (mV)
Fe ²⁺ 1:99 Fe ³⁺	203	244	185	122	203	225	156
Fe ²⁺ 10:90 Fe ³⁺	195	212	159	113	182	211	122
Fe ²⁺ 50:50 Fe ³⁺	171	166	118	76	142	175	84
Fe ²⁺ 90:10 Fe ³⁺	136	125	84	55	103	147	64
Fe ²⁺ 99:1 Fe ³⁺	109	99	74	54	80	137	53

Tabla 11. Registro de los potenciales redox para diferentes vinos sintéticos a pH 3,5.

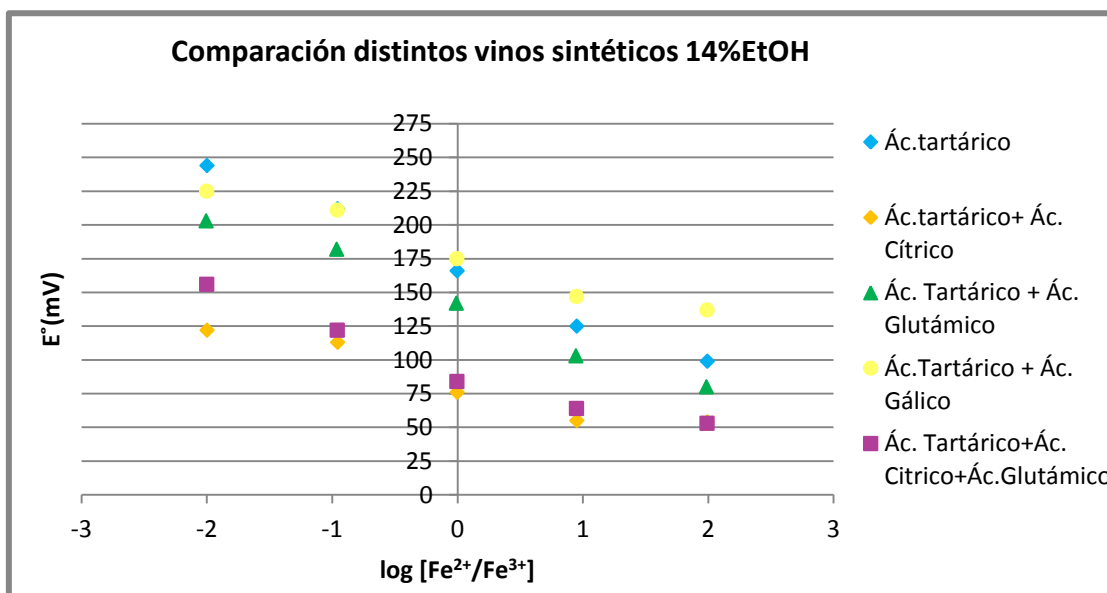


Fig. 6 Representación gráfica que compara el E° vs log [Fe²⁺/Fe³⁺] para los vinos sintéticos preparados con distintos acomplejantes y con un grado alcohólico del 14%.

Una vez seleccionado el vino sintético con el que trabajar, se repitió el procedimiento experimental de la primera parte cambiando la concentración total de Fe de 0,5mM a 0,1mM para ver cómo se modificaba el potencial. Replicando los experimentos para conocer de este modo el margen de error y la reproducibilidad de los mismos y, comparando los valores promedio en la gráfica que se muestra en la figura 9, llama la atención cómo influye en el potencial de forma significativa la concentración de Fe total que contienen las muestras. Las relaciones logarítmicas son prácticamente las mismas, sin embargo, el potencial difiere según la concentración de Fe, siendo menores a mayor concentración.

	Réplica 1	Réplica 2				Promedio		
DISOLUCIONES	E° (mV)	E° (mV)	s	s ²	DSR	E° (mV)	L.C	zs/Vn
Fe ²⁺ 1/99 Fe ³⁺	276	269	4,95	24,5	1,82	273	273 ± 7	6,86
Fe ²⁺ 10/90 Fe ³⁺	244	237	4,95	24,5	2,06	241	241 ± 7	6,86
Fe ²⁺ 50/50 Fe ³⁺	203	197	4,24	18,0	2,12	200	200 ± 6	5,88
Fe ²⁺ 90/10 Fe ³⁺	162	159	2,12	4,50	1,32	161	161 ± 3	2,94
Fe ²⁺ 99/1 Fe ³⁺	138	137	0,707	0,500	0,514	138	138 ± 1	0,980

Tabla 12. Registro de datos obtenidos para 2 réplicas de muestras con un concentración de Fe total de 0,1mM que se prepararon con vino sintético 5g/L de ácido tartárico y 14% de etanol.

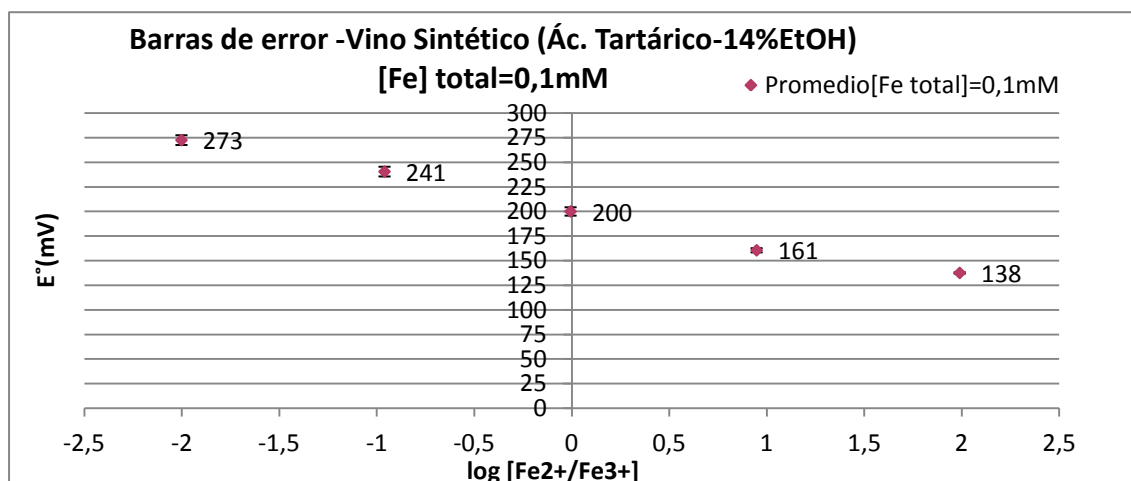


Fig. 7 Representación gráfica con los valores promedio de E° vs $\log [Fe^{2+}/Fe^{3+}]$ y las barras de error de 2 réplicas con una concentración de Fe total de 0,1mM en vino sintético 5g/L de ácido tartárico y 14% etanol.

	Réplica 1	Réplica 2				Promedio		
DISOLUCIONES	E° (mV)	E° (mV)	s	s ²	DSR	E° (mV)	L.C	zs/Vn
Fe ²⁺ 1/99 Fe ³⁺	244	257	9,19	84,5	3,67	251	251 ± 13	12,7
Fe ²⁺ 10/90 Fe ³⁺	212	225	9,19	84,5	4,21	219	219 ± 13	12,7
Fe ²⁺ 50/50 Fe ³⁺	166	180	9,90	98,0	5,72	173	173 ± 14	13,7
Fe ²⁺ 90/10 Fe ³⁺	125	138	9,19	84,5	6,99	132	132 ± 13	12,7
Fe ²⁺ 99/1 Fe ³⁺	99	105	4,24	18,0	4,16	102	102 ± 6	5,88

Tabla 13. Registro de datos obtenidos para 2 réplicas de muestras con un concentración de Fe total de 0,5mM que se prepararon con vino sintético 5g/L de ácido tartárico y 14% de etanol.

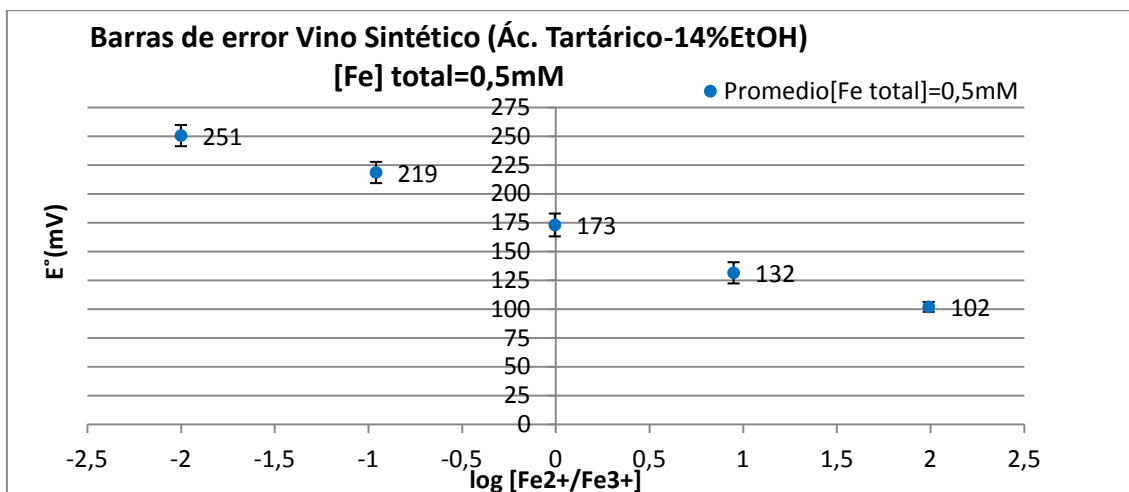


Fig. 8 Representación gráfica con los valores promedio de E^0 vs $\log [Fe^{2+}/Fe^{3+}]$ y las barras de error de 2 réplicas que contenían una concentración de Fe total de 0,5mM en vino sintético 5g/L de ácido tartárico y 14% de etanol.

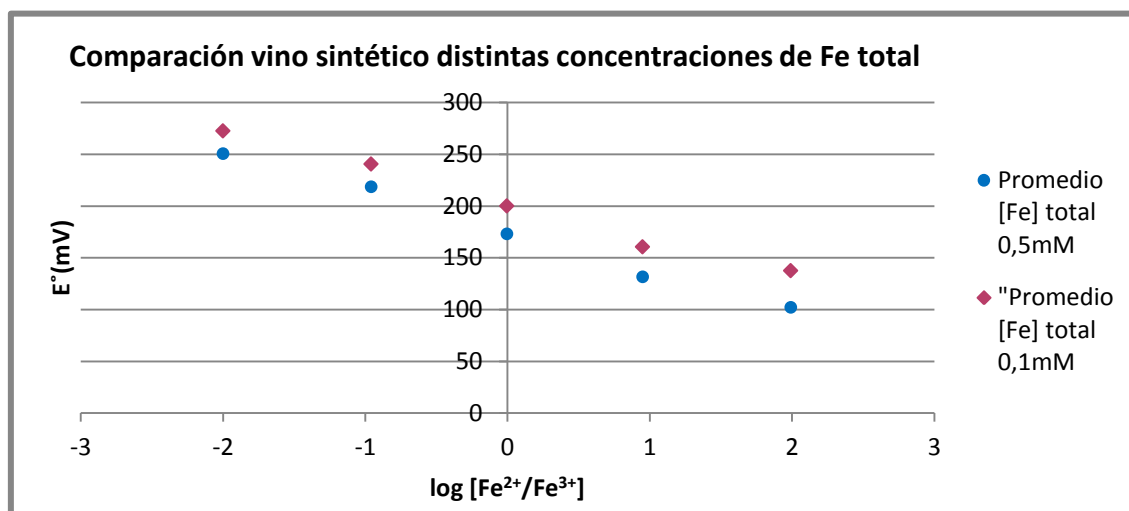


Fig. 9 Representación gráfica con los valores promedio de E^0 vs $\log [Fe^{2+}/Fe^{3+}]$ para muestras preparadas con vino sintético 5g/L de ácido tartárico y 14% de etanol con un contenido en Fe total de 0,1mM y 0,5mM.

4.2 Resultados y discusión estudio de la capacidad reductora de antioxidantes en vino sintético

Tras concluir la primera parte experimental se estudia la capacidad reductora de 6 polifenoles en el vino sintético 5g/L de ácido tartárico y 14% de etanol. Se registran a lo largo de varios días todas las medidas de potencial que aparecen en la tabla 14. Lo primero que se observa en todos los casos es una disminución considerable del potencial a lo largo del tiempo constatando de este modo que el Fe(III) se está reduciendo de forma espontánea a Fe(II). La diferencia de potencial que se produce según el polifenol que contenía la muestra (*ver tabla III anexo II*) es diferente observándose mayores diferencias con catequina hidratada, catecol y quercetina dihidratada que podría indicarnos bien que estos polifenoles favorecen más la reducción del Fe (III) a Fe (II), o bien que los otros la dificultan, como se discutirá posteriormente.

Con los resultados registrados, se comprobó también que incubar las muestras en la estufa durante una y dos semanas a 50°C no se aceleraba la reacción, ya que en casi todas las muestras, menos en la que contenía catequina, la diferencia de potencial era menor cuando las muestras fueron incubadas que cuando no lo fueron.

Además, se observa cómo los potenciales de reducción más bajos se registran en las muestras con ácido gálico, pirogalol y catequina.

<i>Incubación</i>	Sin incubar (recién preparado)	Sin incubar (guardado en la cámara)	1 semana	2 semanas
POLIFENOL	E° inicial (mV)	E° inicial (mV)	E° final (mV)	E° final (mV)
Ác. Gálico - réplica 1	160	100	101	104
Ác. Gálico - réplica 2	-	92	100	101
Promedio Ác. Gálico	160	96	101	103
Ác. Cafeico - réplica 1	166	111	127	118
Ác. Cafeico - réplica 2	-	109	118	117
Promedio Ác. Cafeico	166	110	123	118
Pirogalol- réplica 1	160	111	124	114
Pirogalol- réplica 2	-	105	116	113
Promedio Pirogalol	160	108	120	114
Catequina- réplica 1	186	110	116	93
Catequina- réplica 2	-	94	86	73
Promedio Catequina	186	102	101	83
Catecol- réplica 1	215	112	135	128
Catecol- réplica 2	-	113	141	144
Promedio Catecol	215	113	138	136
Quercetina- réplica 1	223	107	133	137
Quercetina- réplica 2	-	113	138	137
Promedio Quercetina	223	110	136	137

Tabla 14. Registro de las medidas de potencial con diferentes polifenoles de muestras replicadas en vino sintético 5g/L de ácido tartárico y 14% de etanol en diferentes periodos de tiempo.

Para poder conocer también de forma cuantitativa cuanta concentración de Fe(III) queda en las muestras tras la reducción, se aplica el método analítico propuesto por Danilewicz²³. En primer lugar, se construye la recta de calibrado como se ha comentado en la parte experimental, obteniéndose al hacer la regresión por mínimos cuadrados la siguiente ecuación $y = 0,504x + 0,0109$ y un $r^2=0,999$ (ver anexo figura 1). Como el coeficiente de regresión obtenido es muy bueno se decide validar la recta de calibrado y usarla para el estudio posterior.

Además de medir el potencial redox de las muestras, se mide en el espectrofotómetro la absorbancia tras añadir el ferrocino durante 10 minutos. Se construyen las gráficas absorbancia frente al tiempo en segundos, para obtener unas rectas cuya ordenada en el origen es la absorbancia a tiempo cero. Esta es la que se interpola en nuestra recta de

calibrado permitiendo conocer la concentración de Fe(II) de la muestra. Esto permite confirmar si el Fe(III) se ha reducido, tal y como sugiere el potencial redox. Seguidamente, se adiciona ácido ascórbico a la muestra ya medida, se espera 30 minutos a que se complete la reducción del Fe, a fin de obtener con los valores registrados de absorbancia interpolados en la recta de calibrado el Fe total de las muestras. La diferencia entre la concentración de Fe total obtenida y la de Fe(II) nos permite cuantificar cuanta concentración de Fe(III) queda en las muestras y, por tanto, no se ha reducido.

En la tabla IV (*ver anexo*) se muestran las concentraciones de Fe(II), Fe(III) y Fe total tras incubación de una y dos semanas. En todos los casos, la concentración de Fe(III) es menor al cabo de dos semanas, menos en el caso del ácido cafeico que es mayor. No tenemos una explicación para este resultado anómalo, que podría deberse a alguna interferencia en la medida de la absorbancia. Llama la atención como la concentración de Fe total determinada en las muestras con quercetina es muy superior a la añadida. La mayor reducción de Fe (III) a Fe (II) se obtiene con catequina, de acuerdo con la medida de potencial, que también es menor de las que se registran.

Tras realizar la interpolación en la recta de calibrado se aprecia que el valor de concentración de Fe^{2+} obtenido está fuera del rango lineal por lo que se repite el experimento con una de las réplicas y se le aplica una dilución 1:2 a la muestra.

En la tabla 16 se observa cómo la mayor parte del Fe(III) se ha reducido a Fe(II) registrándose unas concentraciones de Fe(II) muy grandes. Salvo en el caso de la muestra con quercetina, los porcentajes de concentración de Fe(II) tras la 1ª y 2ª semana de incubación superan el 93% en todos los casos. Se registra en esta ocasión el porcentaje más alto para la muestra que contiene ácido cafeico. Los resultados recogidos en las tablas 15 y 16 son más fiables que los de la tabla IV (*ver anexo*) puesto que los que ahí aparecen han sido obtenidos por la interpolación de un valor de absorbancia en la recta de calibrado que se salía del rango lineal, cosa que no ocurre si aplicamos una dilución 1:2 sobre las muestras. La muestra preparada con quercetina, al igual que quedaba reflejado en la tabla IV (*ver anexo II*), es en la que se observa una menor reducción del Fe(III) a Fe(II).

Incubación		1 semana			2 semanas		
MUESTRAS	$[\text{Fe}^{3+}]_{\text{inicial}}$ (mg/L)	$[\text{Fe}^{2+}]$ (mg/L)	$[\text{Fe}_{\text{total}}]$ (mg/L)	$[\text{Fe}^{3+}]_{\text{final}}$ (mg/L)	$[\text{Fe}^{2+}]$ (mg/L)	$[\text{Fe}_{\text{total}}]$ (mg/L)	$[\text{Fe}^{3+}]_{\text{final}}$ (mg/L)
ÁCIDO GÁLICO	5,64	5,52	5,68	0,162	5,44	5,64	0,195
ÁCIDO CAFEICO	5,64	5,52	5,62	0,0990	5,28	5,31	0,0340
PIROGALOL	5,64	5,52	5,73	0,212	5,58	5,67	0,0840
CATEQUINA	5,60	5,56	5,69	0,130	5,07	5,69	0,618
CATECOL	5,60	5,44	5,80	0,354	5,51	5,67	0,161
QUERCETINA	5,60	5,38	6,29	0,911	5,39	6,32	0,933

Tabla 15. Registro de las concentraciones de Fe (mg/L) presentes en las muestras con diferentes polifenoles y con una dilución 1:2. Las muestras han sido preparadas en vino sintético 5g/L de ácido tartárico y 14% de etanol, en diferentes periodos de tiempo.

	1 SEMANA EN LA ESTUFA		2 SEMANA EN LA ESTUFA	
	[Fe ²⁺] (mg/L)	% [Fe ²⁺] (mg/L)	[Fe ²⁺] (mg/L)	% [Fe ²⁺] (mg/L)
ÁCIDO GÁLICO	5,52	97,1	5,44	96,5
ÁCIDO CAFEICO	5,52	98,2	5,28	99,4
PIROGALOL	5,52	96,3	5,58	98,5
CATEQUINA	5,56	97,7	5,07	89,1
CATECOL	5,44	93,9	5,51	97,2
QUERCETINA	5,38	85,5	5,39	85,2

Tabla 16. Registro de la concentración de Fe (II) y del porcentaje de Fe (II) obtenidos para las muestras a las que se les aplica una dilución 1:2.

4.3 Resultados y discusión estudio del comportamiento del Fe(III) en el vino sintético, en condiciones anóxicas con y sin la presencia de ácido gálico

Para concluir el estudio, se compara la evolución del contenido de Fe(II) en muestras conteniendo distintas concentraciones de Fe(III) y cuya diferencia radica únicamente en la presencia o ausencia de ácido gálico. Puede observarse en la tabla 17 cómo en todos los casos excepto el primer día, la reducción de Fe(III) a Fe(II) es mayor en ausencia de polifenol.

Estos resultados indican que no es el polifenol la especie donora de electrones responsable de la reducción de Fe(III) a Fe(II). Las dos únicas especies que podrían donar los electrones serían, o bien el etanol cuando pasa a acetaldehído, o bien el ácido tartárico cuando se degrada, pero el estudio de este proceso ya está fuera de los objetivos del presente trabajo.

Este trabajo ha demostrado que el Fe(III) es inestable en condiciones anóxicas, independientemente de la presencia de polifenoles.

Fecha medidas	04/05/2016		05/05/2016		09/05/2016		11/05/2016	
	% [Fe ²⁺]	[Fe ²⁺] (mg/L)	% [Fe ²⁺]	[Fe ²⁺] (mg/L)	% [Fe ²⁺]	[Fe ²⁺] (mg/L)	% [Fe ²⁺]	[Fe ²⁺] (mg/L)
Vino Sintético Fe ³⁺ (10mg/L)	19,4	1,94	34,6	3,47	69,6	6,96	81,2	8,12
Vino Sintético Fe ³⁺ (30mg/L)	18,4	5,52	26,6	7,97	60,0	18,0	78,7	23,7
Vino Sintético Fe ³⁺ (100mg/L)	13,6	13,6	19,4	19,4	50,4	50,4	68,6	68,6
Vino Sintético Fe ³⁺ (10mg/L) + Ác.Gálico	30,8	3,08	33,1	3,31	58,9	5,88	71,6	7,16
Vino Sintético Fe ³⁺ (30mg/L) + Ác.Gálico	27,1	8,12	34,7	10,4	52,2	15,7	67,7	20,1
Vino Sintético Fe ³⁺ (100mg/L) + Ác.Gálico	18,9	18,9	17,4	17,4	46,0	46,0	59,5	59,5

Tabla 17. Registro de las concentraciones y porcentajes de Fe (II) presentes en las muestras con dilución 1:2. Las muestras han sido preparadas en vino sintético 5g/L de ácido tartárico y 14% de etanol y las medidas han sido tomadas en diferentes días.

5. CONCLUSIONES

- El potencial redox de vinos modelo conteniendo distintas relaciones Fe(III)/Fe(II) responde en todos los casos a dicha relación. Como era de esperar el potencial se hace más negativo al aumentar la proporción de Fe(II).
- No obstante, el potencial redox depende de todos los factores composicionales estudiados, además de la relación Fe(III)/Fe(II): grado alcohólico, concentración total de Fe, tipo de polifenol presente, acomplejantes.
- La medida del potencial redox da un valor aproximado pero válido de la relación Fe(III)/Fe(II), tal y como se ha confirmado con el uso del método alternativo del ferrocino.
- Los polifenoles no son necesarios para que se produzca en anoxia la reducción espontánea de Fe(III) a Fe(II). El Fe(III), es por tanto, una especie inestable en medio anóxico en las condiciones estudiadas. De este modo, puede proponerse que dicha reducción tiene que venir ligada a la auto-oxidación de alguna de las especies presentes en el medio: ácido tartárico, etanol o agua, aspecto que tendrá que ser abordado en estudios posteriores.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Park, S. K.; Boulton, R. B.; Bartra, E.; Noble, A. C., Incidence of volatile sulfur-compounds in California wines. A preliminary survey. *American Journal of Enology and Viticulture* **1994**, *45*, 341-344.
2. Geloso, J., Relation entre le vieillissement des vins et leur potentiel d'oxydoréduction. *Ann Brasser Dist* **1931**, *29*, 177-193.
3. Ribéreau-Gayon J., Oxydation et réduction dans les vins. Thèse Docteur en sciences physiques. Université de Bordeaux **1933**.
4. Deibner, L., Recherche sur les techniques de mesure du potentiel d'oxydoréduction dans le jus de raisin et les vins. *Ann Technol Agric* 1956 **1981**, *22*, 77-90.
5. Pontallier, P., Recherches sur les conditions d'élevage des vins rouges. Rôle des phénomènes oxydatifs. Thèse Docteur Ingénieur. Université de Bordeaux II **1981**.
6. Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y; Maujean, A.; Dubourdieu, D., L'élevage des vins rouges en cuve et en fût. Les phénomènes du vieillissement. En: *Traité d'oenologie*. Tomo 2. Chimie du vin, Stabilization et traitements. Ed. Dunod, París **1998**, 451-500.
7. Feuillat, M.; Naudin, R.; Peyron, D., Élevage des vins sous bois: expérimentations en Bourgogne. En: *OEnologie: Fondements scientifiques et technologiques*. Ed. Claude Flancy, Lavoisier, París **1998**, 1027-1044.
8. Zamora, F., Contribution a l'étude des phénomènes d'oxydation du vin. Mémoire de DEA OEnologie Ampélogie. Université de Bordeaux II **1989**.
9. Kilmartin, P.A.; Zou, H.L., The effect of electrode material on the measured redox potential of red and white wines. *Electroanalysis* **2001**, *13(16)*, 1347-1350.
10. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R., Principios de análisis instrumental. Cengage Learning, 6ª edic. **2011**, 627-692.
11. Vivas, N.; Glories, Y.; Bertrand, A.; Zamora, F., Principe et méthode de mesure du potentiel d'oxydoréduction dans les vins. *Bulletin de l'OIV* **1996**, 785-786, 618-633.

12. Glories, Y.; Zamora, F., Étude des facteurs dont depend le potentiel d'oxydoreduction du vin. Rapport d'Activités de Recherche 1988-1990. Institut d'OEnologie. Université de Bordeaux **1991**, 95-96.
13. Vivas, N.; Zamora, F.; Glories, Y., Étude des phénomènes d'oxydoréduction dans les vins. Mise au point d'une méthode rapide de mesure du potentiel d'oxydoréduction. *J Int Sci Vigne Vin* **1992**, 26, 271-285.
14. Halliwell, B., How to characterize an antioxidant: an update. *Biochemical Society Symposia* **1995**, 61, 73-101.
15. Urgantodo, V., Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en métodos celulares. *Tesis Doctoral, Universidad de Barcelona* **2009**, 33-39.
16. Benzie, I. F. F.; Strain, J. J., The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* **1996**, 239, 70-76.
17. Cao, G. H.; Prior, R. L., Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry* **1998**, 44, 1309-1315.
18. Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F., Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, 48, 3396-3402.
19. Collins, P. F.; Diehl, H.; Smith, G. F., 2,4,6-Tripyridyl-s-triazine as a reagent for iron. Determination of iron in limestone, silicates and refractories. *Analytical Chemistry* **1959**, 31, 1862-1867.
20. Collins, P.; Diehl, H., Determination of iron in wine using 2,4,6-Tripyridyl-s-triazine. *Analytica Chimica Acta* **1960**, 22, 125-127.
21. Karamanev, D. G.; Nikolov, L. N.; Mamatarkova, V., Rapid simultaneous quantitative determination of ferric and ferrous ions in drainage waters and similar solutions. *Minerals Engineering* **2002**, 15, 341-346.
22. Paipa, C.; Mateo, M.; Godoy, I.; Poblete, E.; Toral, M. I.; Vargas, T., Comparative study of alternative methods for the simultaneous determination of Fe⁺³ and Fe⁺² in leaching solutions and in acid mine drainages. *Minerals Engineering* **2005**, 18, 1116-1119.
23. Danilewicz, J. C., Fe(II):Fe(III) ratio and redox status of white wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **2016**, (in press).
24. Nikolantonaki, M.; Waterhouse, A. L., A method to quantify quinone reaction rates with wine relevant nucleophiles: A key to the understanding of oxidative loss of varietal thiols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, 60, 8484-8491.
25. UV - Vis Shimadzu UV -1700 model Spectrophotometer: http://www.labinstcol.com/pdtos_espectro_uvisible.htm
26. UV - Vis Shimadzu UV -1700 model Spectrophotometer: <http://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Shimadzu%20UV-1700%20users%20guide.pdf>
27. Portable meter JENCO 6230N: <https://jencoi.com/wp-content/uploads/2016/05/6230M.pdf>
28. Protocolo de uso de la Cámara de guantes http://www.jacomex.fr/uploads/tx_biproduits/GP_campus__FR.pdf
29. PubChem Reactives: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>
30. Patrón redox 220mV: <http://www.crisoninstruments.com/es/laboratorio/disoluciones-/patron-redox/disolucion-patron-redox-220-mv>

ANEXO I

T (°C)	EA (mV)
10	245
15	236
20	228
25	220
30	212
35	204
40	195
50	178
60	160
70	142

Tabla I. Variación del potencial del patrón redox 220mV en función de la temperatura del laboratorio

RECTA CALIBRADO	
[Fe ²⁺] (mg/L)	Abs
0,000	0,010
0,500	0,269
1,00	0,506
1,50	0,769
2,00	1,044
2,50	1,276
3,00	1,478
3,50	1,744
4,00	2,069

Tabla II. Registro de absorbancias para la construcción de la recta de calibrado con diferentes concentraciones de Fe (II)

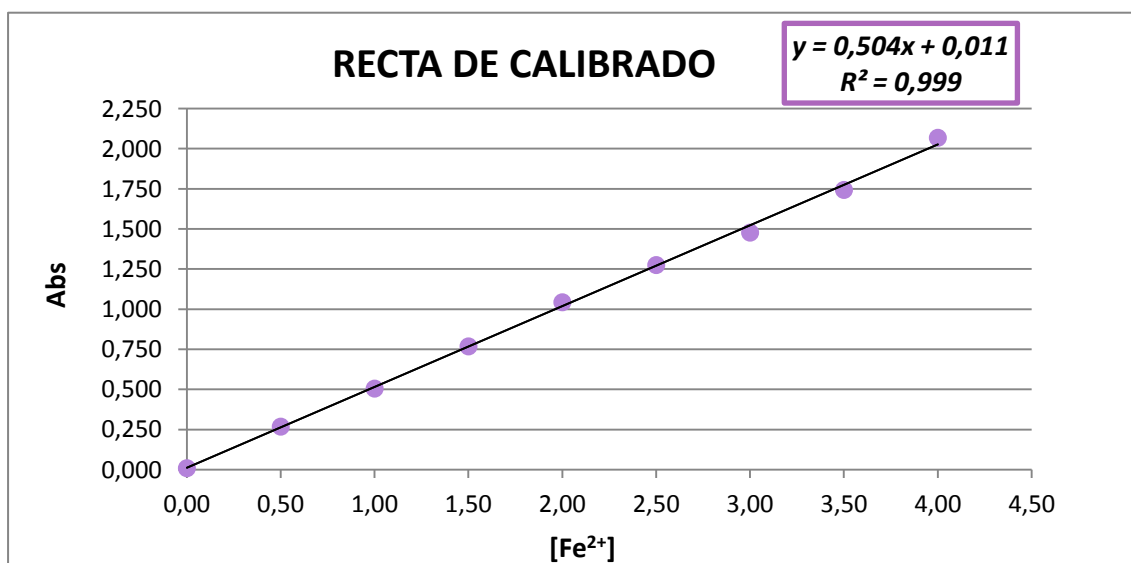


Fig I. Representación de la concentración Fe²⁺ de 0 hasta 4 mg/L frente a la absorbancia registrada. En esta gráfica se muestra la recta de calibrado y la ecuación que se empleará para interpolar los valores de absorbancia registrados durante todo el estudio de la capacidad reductora de los polifenoles.

ANEXO II

Muestra	$\Delta E^{\circ}1$ (mV)	$\Delta E^{\circ}2$ (mV)	$\Delta E^{\circ}3$ (mV)
Promedio Ác. Gálico	64	60	58
Promedio Ác. Cafeico	56	44	49
Promedio Pirogalol	52	40	47
Promedio Catequina	84	85	103
Promedio Catecol	103	77	79
Promedio Quercetina	113	88	86

Tabla III. Registro de las diferencias de potencial promedio obtenidas con diferentes polifenoles en vino sintético 5g/L de ácido tartárico y 14% de etanol en diferentes periodos de tiempo. Siendo $\Delta E^{\circ}1$ diferencia de potencial entre las muestras recién preparadas y las guardadas en cámara durante varios días, $\Delta E^{\circ}2$ diferencia de potencial entre las muestras recién preparadas e incubada 1 semana y $\Delta E^{\circ}3$ diferencia de potencial entre las muestras recién preparadas e incubadas 2 semanas.

	Incubación	(1 semana)				(2 semanas)		
	Réplicas	[Fe ³⁺ _{inicial}] (mg/L)	[Fe ²⁺] (mg/L)	[Fe _{total}] (mg/L)	[Fe ³⁺ _{final}] (mg/L)	[Fe ²⁺] (mg/L)	[Fe _{total}] (mg/L)	[Fe ³⁺ _{final}] (mg/L)
ÁCIDO GÁLICO	Réplica 1	5,64	4,95	5,41	0,460	4,92	5,41	0,494
	Réplica 2	5,64	4,98	5,41	0,433	5,08	5,41	0,336
	MEDIA	5,64	4,97	5,41	0,446	5,00	5,41	0,415
ÁCIDO CAFEICO	Réplica 1	5,64	4,78	5,21	0,427	4,81	5,41	0,602
	Réplica 2	5,64	4,87	5,41	0,542	4,95	5,36	0,405
	MEDIA	5,64	4,83	5,31	0,485	4,88	5,38	0,504
PIROGALOL	Réplica 1	5,64	4,98	5,41	0,435	5,04	5,41	0,376
	Réplica 2	5,64	4,96	5,41	0,449	5,08	5,41	0,332
	MEDIA	5,64	4,97	5,41	0,442	5,06	5,41	0,354
CATEQUINA	Réplica 1	5,60	5,11	5,41	0,300	5,13	5,41	0,281
	Réplica 2	5,60	4,99	5,41	0,426	5,12	5,41	0,288
	MEDIA	5,60	5,05	5,41	0,363	5,13	5,41	0,285
CATECOL	Réplica 1	5,60	4,54	5,41	0,870	4,74	5,41	0,674
	Réplica 2	5,60	4,24	5,41	1,17	4,32	5,41	1,09
	MEDIA	5,60	4,39	5,41	1,02	4,53	5,41	0,883
QUERCETINA	Réplica 1	5,60	5,38	6,29	0,911	5,39	6,32	0,933
	Réplica 2	5,60	4,88	5,93	1,05	5,02	6,00	0,980
	MEDIA	5,60	5,13	6,11	0,983	5,20	6,16	0,957

Tabla IV. Registro de las concentraciones de Fe (mg/L) presentes en las muestras replicadas con diferentes polifenoles en vino sintético 5g/L de ácido tartárico y 14% de etanol en diferentes periodos de tiempo obtenidas al interpolar los valores de absorbancia obtenidos para cada una de ellas en la recta de calibrado.