

Estudios de cuantificación de metales en el proceso fermentativo de un vino y de su complejación con ligandos naturales

J.M. Fernández, I. Esparza, C. Santamaría

Departamento de Química y Edafología, Universidad de Navarra,
Irunlarrea 1, 31008 Pamplona (España)
jmfdez@unav.es

Recibido: 07/03/2006

Revisado: 02/05/2006

Aceptado: 11/05/2006

RESUMEN

Se ha realizado la cuantificación de ciertos metales de interés como Zn, Cu, Mn y Fe, mediante la técnica de espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado por inducción (ICP-AES), en muestras de vino a lo largo de su fermentación durante 345 días. Los resultados obtenidos muestran la disminución de las concentraciones de Cu y Fe con el tiempo de fermentación y que las concentraciones de Zn y Mn se mantienen estables en el mismo periodo de tiempo. Así mismo, se han llevado a cabo estudios electroquímicos de complejación con disoluciones tamponadas a pH 4 (similar al valor natural del vino) que contenían un ligando modelo, la catequina, con el fin de verificar la aplicabilidad de la técnica de voltamperometría de redisolución anódica de pulso diferencial al estudio de muestras acondicionadas a ese pH. Estos estudios han permitido establecer que la estequiometría de los complejos catequina:metal formados es 1:1 tanto para el Zn como para el Cu. El comportamiento electroquímico de una muestra de vino diluida y analizada de forma similar a la de estas disoluciones de ligando modelo, permite sugerir que una parte importante de los ligandos naturales presentes en el vino, capaces de complejar al Zn y al Cu, tiene una naturaleza muy similar a la de la catequina. **Palabras clave:** metales, redisolución anódica, catequina, vino

ABSTRACT

Wine samples fermented up to a maximum of 345 days have been monitored, and concentrations of Zn, Cu, Mn and Fe have been measured by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES). Results show a decrease throughout the fermentation time for Cu and Fe concentrations while Zn and Mn concentrations remained stable for the same period of time. Electrochemical techniques were used to perform complexation studies from pH 4 buffered solutions (pH of the wine) containing a model ligand, catechin, to prove the applicability of differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV) technique to study samples conditioned at the above mentioned pH. The stoichiometry found for the catechin:metal complexes was 1:1 both for Zn and Cu. The electrochemical behaviour of a diluted wine sample subjected to identical experimental conditions as those applied to the model ligand solutions, suggested that the majority of the natural ligands present in wine, able to complex Zn and Cu, have a very similar structure to that of catechin. **Keywords:** metals, stripping voltammetry, catechin, wine.

Introducción

El vino es, desde el punto de vista químico, una matriz muy compleja debido a la gran cantidad de compuestos orgánicos e inorgánicos que lo componen, siendo todas estas sustancias las responsables de sus tan apreciadas propiedades organolépticas. La mayor parte de los estudios realizados hasta el momento se ha centrado en la parte orgánica de los vinos atribuyéndose, por ejemplo, a los compuestos polifenólicos (anto-

cianinas, taninos, catequinas, ...) las diferencias en color y sabor observadas entre vinos tintos y blancos¹. De hecho, el color es uno de los aspectos organolépticos más importantes de un vino ya que, junto con su contenido alcohólico, son las dos variables analizadas a la hora de establecer el valor económico de un vino.

En el caso de los vinos tintos, el color depende principalmente de su composición fenólica, siendo las antocianinas los compuestos responsables de

su color rojo-azulado. Estas moléculas son muy reactivas y pueden sufrir reacciones de descomposición y combinación a lo largo del proceso de vinificación, que afectarán al color final del vino². Además, algunas de estas moléculas presentan un grupo orto-difenol unido al anillo aromático, lo que les permitirá complejar algunos cationes metálicos como Al^{3+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , induciendo un efecto batocrómico observable al registrar el espectro correspondiente³⁻⁵. Los taninos también pueden sufrir reacciones de complejación similares que darán lugar a la llamada “quiebra azul”⁴⁻⁵. Otros autores también han confirmado la importancia de los complejos metal-polifenol ya que pueden afectar y distorsionar los equilibrios naturales existentes en el vino, dando lugar a modificaciones en su color⁶⁻⁹.

Sin embargo, hay que mencionar la presencia de otros procesos de complejación que involucran antocianinas y polifenoles, dando lugar a procesos de copigmentación que afectan al color final del vino, originando nuevamente desplazamientos batocrómicos o hiperocrómicos en función de los compuestos participantes en los complejos, que pueden ser ácidos cinámicos, flavonoles y flavonas glicosiladas⁴.

Con respecto a los estudios realizados con polifenoles, Chicón y colab. determinaron la evolución del contenido en antocianinas a lo largo de los 7 primeros días de fermentación, para un vino variedad Tempranillo¹⁰. Los resultados obtenidos mostraron un aumento continuo de la concentración de estos compuestos durante el periodo de tiempo estudiado. De manera similar Esparza y colab. realizaron un estudio más completo al analizar muestras tomadas a lo largo de un proceso de fermentación de 1 año, encontrándose relaciones metal-polifenol de gran interés¹¹. Además de estudiar la evolución del contenido en polifenoles totales e individuales con el tiempo, los autores realizaron la separación cromatográfica de una de las muestras de vino con el fin de determinar la posible agrupación polifenol individual-metal en alguna de las fracciones obtenidas. Se observó una elevada correlación entre la antocianina cianidin-3-glucósido, y los metales Zn y Cu.

Los resultados alcanzados evidencian el papel relevante de los metales tanto en la redistribución de los equilibrios a lo largo del proceso de fermentación, como en las propiedades finales de los caldos. En este sentido, es conocido que metales tales como Fe, Cu, Mn y Zn, presentes en uvas, pueden actuar como catalizadores de sistemas biológicos, promotores de ciertas enzimas, o participar en reacciones redox necesarias para el metabolismo de algunas células¹². Además, su presencia juega un papel muy importante en la estabilidad, color, claridad, e incluso afectan a las características organolépticas de los vinos. Así, el Zn se relaciona con la persistencia del sabor agrio del vino, el Fe con la alteración de su sabor y el Pb con su posible toxicidad¹³.

De todo lo anterior se deduce la importancia de conocer el contenido en metales de los vinos y así se han realizado estudios de distintas variedades y orígenes que permiten conocer los intervalos de concentración más habituales en los que se encuentran estos elementos¹⁴⁻¹⁶. La mayor parte de los estudios reportados se han realizado mediante espectroscopía de absorción atómica (AAS) e ICP-AES.

Por otro lado, la identificación y cuantificación de metales en vino se ha considerado de gran interés ya que permite la definición de lo que se llama “huella dactilar” de cada uno de ellos, lo que permitirá verificar en cada caso su Denominación de Origen. Esta “huella” manifiesta que la composición del vino está fuertemente influida por los factores relacionados con el área específica de producción (variedad de uva, suelo y climatología, levaduras y prácticas de cultivo y vinificación), por lo que siempre habrá metales característicos para cada zona de cultivo. En este sentido, se han publicado estudios de vinos procedentes de Galicia (*Ribeira Sacra*)¹⁷ y Grecia¹⁸ mediante las mismas técnicas ya mencionadas (AAS e ICP-AES).

Si bien la distribución de los metales en las distintas partes de la uva (semillas, pulpa y piel)¹⁹⁻²⁰ es bien conocida, su evolución a lo largo del proceso de maduración de las uvas y de fermentación del vino ha sido poco estudiada.

Las técnicas electroquímicas también se han empleado con cierta frecuencia durante los últimos años para la realización de estudios de metales pesados en vinos. Las técnicas de redisolución, tanto voltamperométricas como potenciométricas, han sido las más empleadas, permitiendo llevar a cabo la determinación de la concentración de metal total²¹⁻²³ y/o metal lábil²⁴⁻²⁷ en la muestra, en función del tratamiento a que se haya sometido la misma. En todos ellos, los equilibrios naturales existentes en el vino se ven necesariamente modificados, puesto que recurren a la digestión, acidificación y/o dilución acuosa sin control del pH final. Estudios previos llevados a cabo con respecto al efecto de la dilución sobre parámetros cromáticos²⁸ concluyeron que la dilución sin tamponar conduce a la distorsión del estado natural del vino.

En el presente trabajo se pretende mostrar la evolución de la concentración total de Fe, Cu, Zn y Mn en muestras de vino tomadas a distintos tiempos de fermentación, para un periodo de vinificación de un año, medidas mediante ICP – AES tras su digestión. Además, se estudiará el estado de complejación metal-antocianina median-te técnicas electroquímicas. Para ello se escogerá un compuesto modelo, catequina, de estructura similar a una de las antocianinas mayoritarias en el vino, cianidin-3-glucósido, que está especialmente asociada a Cu y Zn¹¹. A diferencia de lo reportado hasta el momento, nuestro interés es poder efectuar un seguimiento de la complejación sin alterar los equilibrios naturales existentes en las muestras. Por ese motivo se escoge un medio tamponado de pH a un valor muy próximo al del vino²⁹. El estudio se completará con el análisis de una muestra de vino, tratada del mismo modo que la catequina, con el fin de verificar si el procedimiento es válido para muestras reales.

Parte experimental

1.-Reactivos: Ácido nítrico *sub – boiling*, obtenido a partir de ácido nítrico 53% PA, Panreac. Agua ultrapura de calidad Milli-Q (resistividad <math><18\text{M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}</math>) (Waser-lab G.R. Type I-reagent grade-water system; Millipore). Estándares de Zn, Cu, Fe y Mn (Certipure Merck de 1000 ppm cada uno). Alcohol etílico 99%, Oppac. Ácido acético

glacial 100%, Merck (Suprapur). Acetato sódico, Merck (Suprapur). (+)-Catequina (3,3',4',5,7-penta-hidroxi-flavano), Fluka. Fosfato disódico anhidro PA, Panreac. Fosfato monosódico dihidrato, Panreac

2.-Instrumentación: Microondas:Ethos Plus (Milestone), con rotor segmentado de alta presión y sensor de temperatura modelo HPR-1000/10S. Vasos de Teflon® (referencia P/N 34040) con tapas (referencia P/N 35140), platos adaptadores (referencia P/N 34306), anillos de seguridad (referencia P/N 35148), revestimientos de seguridad (referencia P/N 34119) y rotores segmentados para ATC-400 (referencia P/N 50212). Espectrómetro ICP – AES: ISA-Jobin Yvon JY 38S. Baño Ultrasónico: Elma Ranssonic 310. Medidas electroquímicas: 746 Metrohm Trace Analyser acoplado a una celda 747 VA Stand, que fue empleado para monitorizar la complejación de Zn. Autolab PGSTAT 12 (EcoChemie) acoplado a una celda 663 VA Stand, que fue utilizado para el análisis con Cu.

3.-Muestras: El estudio fue realizado con muestras de vino tinto obtenidas a partir de uva *Vitis vinifera* de variedad Tempranillo de Navarra (España) obtenidas en una parcela experimental y controlada por la Estación de Viticultura y Enología de Navarra (EVENA). Las muestras se tomaron desde el primer día de fermentación hasta el día número 345 y se prepararon a partir de 800 kg de uvas que fueron procesadas en EVENA siguiendo los procedimientos habituales de elaboración de vino. Durante los primeros 15 días de fermentación, las muestras se tomaron diariamente; el muestreo fue semanal durante las cuatro semanas siguientes y en adelante fue mensual. A partir del día 160 de fermentación, para el cual las fermentaciones alcohólica y maloláctica han finalizado, el vino obtenido fue transferido del tanque de fermentación a dos barricas de roble americano. Antes de introducir el vino en las barricas de roble, una mitad fue clarificada y filtrada mientras que la otra mitad fue introducida en la barrica manteniendo los hollejos y semillas de las uvas. Por lo tanto, a partir del día 160 se tomaron las muestras por duplicado, correspondiendo cada una de ellas a una barrica distinta.

4.-Procedimiento analítico:

4.1.- Digestión de las muestras: Antes de determinar el

contenido en metales de las muestras, éstas fueron digeridas por microondas. Se emplearon volúmenes de 1.5 mL de las muestras de vino a los que se añadieron 8 mL de HNO₃. Cada una de las muestras fue digerida por triplicado. El programa de temperaturas y potencia aplicado por el microondas fue el siguiente:

Paso 1: 0-90°C durante 9 min a 1000W

Paso 2: 90°C durante 5 min a 1000W

Paso 3: 90-120°C durante 8.5 min a 1000W

Paso 4: 120-170°C durante 6 min a 1000W

Paso 5<. 170°C a 1000W

Una vez enfriadas a temperatura ambiente, las muestras se llevan a un volumen final de 10 mL con agua ultra pura.

4.2.- Medidas de ICP-AES: Se prepararon rectas de calibrado para Fe, Cu, Zn y Mn a partir de sus estándares concentrados manteniendo la proporción de ácido que contienen las muestras digeridas.

Las condiciones instrumentales empleadas para cada uno de los cuatro elementos fueron las mostradas en la tabla 1.

5.-Estudios electroquímicos:

5.1. Preparación de las disoluciones: Las disoluciones estándar de Zn y Cu se prepararon por dilución en tampón acético-acetato (etanol 8%) a pH 4 de sus estándares concentrados.

Las disoluciones concentradas de (+)-Catequina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavano) se prepararon en tampón acético-acetato (etanol 8%) a pH 4 después de disolver el compuesto en un baño de ultrasonidos durante unos 10 min. A partir de esta disolución madre se prepararon por sucesivas diluciones las disoluciones de concentración adecuada.

En el caso de las medidas realizadas a pH 8, tanto las disoluciones concentradas de catequina como de patrones de Zn y Cu, se prepararon en tampón fosfato a pH 8.

5.2. Procedimiento: La técnica electroquímica aplicada fue la voltamperometría de redisolución anódica de pulso diferencial. El procedimiento empleado consiste en colocar en la celda electroquímica la disolución a estudiar, purgarla durante 10 min mediante el paso de una corriente de nitrógeno y hacer adiciones sucesivas de la disolución de Cu o Zn. Después de cada una de las adiciones de metal, y antes de realizar la medida, se

Tabla 1: Condiciones experimentales empleadas para la realización de las medidas de ICP - AES

	Metal			
	Zn	Fe	Cu	Mn
λ (nm)	213.856	238.204	324.754	257.610
Flujo de gas del plasma interior (L/min)	12	12	12	12
Flujo de gas del plasma exterior (L/min)	0.3	0.3	0.3	0.3
Presión del nebulizador (bar)	2.6	2.6	2.6	2.6
Flujo de gas del nebulizador(L/min)	0.45	0.45	0.45	0.45
Tiempo de integración (s)	0.5	0.5	0.5	0.5
Modo de lectura	Modo 2	Modo 2	Modo 2	Modo 2
Número de puntos	9	9	9	9
Intervalo de Calibración (µg/L)	0-1.2	0-3	0-1.2	0-1.2
Recta Calibrado	$y=737.9x+58.81$	$y=246.1x+46.1$	$y=712.6x+119.1$	$y=690.9x+18.8$
Coefficiente Correlación	0.9999	0.9986	0.9999	0.9999
Límite de Detección (µg/L) ^a	0.0063	0.034	0.0002	0.0021
Límite de Cuantificación (µg/L) ^a	0.021	0.115	0.0007	0.007

^a Los límites de detección y cuantificación se han calculado utilizando la concentración equivalente de fondo (BEC) y siguiendo el procedimiento establecido por Thomson y colab.³⁰

acondiciona la disolución durante el tiempo necesario (30 min para Zn y 60 s para Cu) y a continuación tiene lugar la etapa de preconcentración o acumulación. En ambos casos (Zn y Cu) se ha empleado un tiempo de acumulación, t_{acc} , de 60 s, en todas las medidas realizadas. Los potenciales aplicados durante el periodo de acumulación fueron de -1.200 V para Zn y -1.200 ó -0.600 V para Cu. En ambos equipos se ha utilizado el máximo tamaño de gota. Respecto a las condiciones de medida, se han aplicado unas velocidades de barrido de 20 y 25 mVs^{-1} para Zn y Cu, respectivamente. Todas estas condiciones fueron optimizadas por los autores.

Con el fin de verificar que las condiciones de medida aplicadas a las muestras del ligando modelo son también válidas para muestras reales, se ha estudiado el comportamiento de la muestra correspondiente al día 21 de fermentación, cuya concentración total de metales fue determinada en la primera parte del trabajo, comprobándose que esas condiciones son perfectamente aplicables.

Discusión y resultados

1.- Evolución del contenido total de metales a lo largo de un año de vinificación

El estudio se realizó a partir de 32 muestras que cubrieron un periodo de vinificación de 345 días.

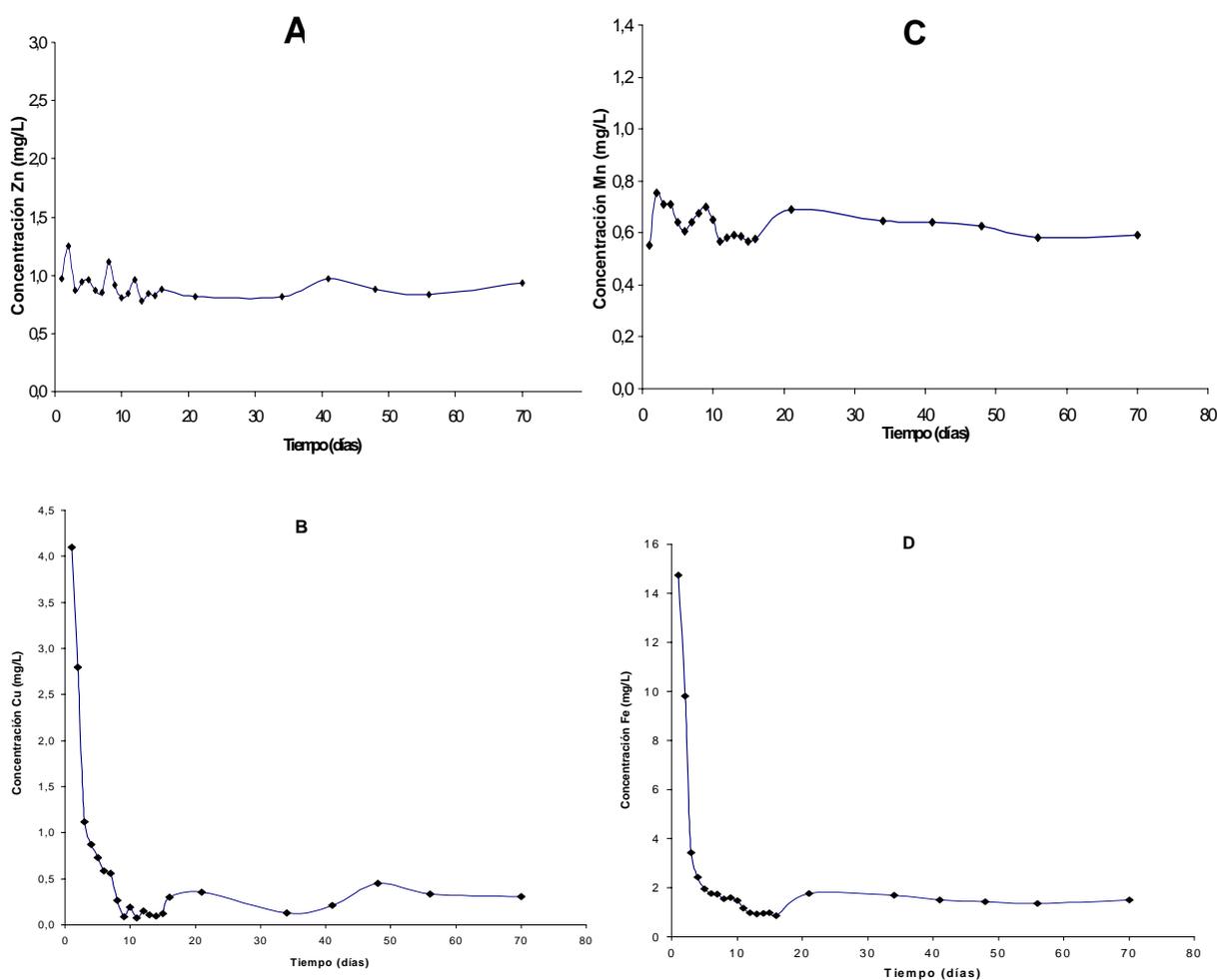


Figura 1: Evolución del contenido total en A = Zinc; B = Cobre; C = Manganeso; D = Hierro, con el tiempo de vinificación.

Los resultados se muestran en la figura 1 (en la figura sólo se reflejan los 70 primeros días de fermentación, ya que es en estos días donde se observan más cambios, manteniéndose a partir de entonces los valores prácticamente constantes). Como puede verse, el comportamiento mostrado por cada uno de los metales es distinto. En el caso de Cu y Fe, sus concentraciones muestran un descenso importante durante los 5 primeros días, ralentizándose la velocidad de decrecimiento hacia los 10 días, tiempo a partir del cual se alcanza un valor de concentración constante. Las concentraciones de Mn y Zn muestran una ligera variación con el tiempo, manteniéndose prácticamente constantes a valores 0.5 y 1 mg/L respectivamente. Hasta ahora, no se ha encontrado en la bibliografía pueden ocurrir dos fenómenos muy conocidos en el mundo de la enología, que son las quiebras férrica y cúprica^{3,5}. El hierro férrico puede reaccionar con los compuestos fenólicos y dar un complejo que en un principio es soluble y al poco tiempo floclula dando lugar a una precipitación (quiebra férrica). La quiebra cúprica, por su parte, está relacionada con la reducción del Cu^{2+} y su posterior precipitación en estado coloidal en forma de sulfuro de cobre.

Para que se verifique esta quiebra cúprica, se requiere una concentración mínima de cobre de 0.5 mg/L. Como puede apreciarse en la figura 1, durante los primeros días de fermentación la concentración de este elemento es muy superior a este valor, por lo que es razonable considerar que este proceso es el que provoca la disminución de este parámetro con el tiempo de fermentación hasta alcanzar un valor inferior a 0.5 mg/L.

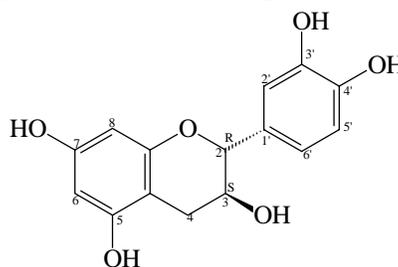
Una vez superados los primeros días de fermentación en los que se aprecian los cambios más notables, se comprueba que la concentración de todos los metales estudiados se mantiene estable a lo largo del tiempo, siendo los valores alcanzados acordes con los encontrados en la bibliografía para vinos tintos (Fe: 1 – 5 mg/L, Cu: 0.01 – 1 mg/L, Zn: 0.5 – 3.5 mg/L y Mn: 1 – 6 mg/L)^{14,16}. En el caso del manganeso, los valores obtenidos son algo más bajos de lo reportado en la bibliografía, pero hay que tener en cuenta que se trata de uno de los elementos característicos de cada región geográfica y que intervienen en la llamada “huella dactilar”, por lo

que los valores se ven condicionados por las características edáficas de la región de procedencia.

Uno de los objetivos del trabajo es comparar el comportamiento del vino después de haber sido transferido a las barricas de roble, dependiendo de si ha sido filtrado y clarificado previamente o de si continúa acompañado por los hollejos y semillas de la uva. Las diferencias encontradas entre ambos tipos de muestras son poco significativas, indicando que desde el día 160 hasta el 345 de la fermentación no tiene lugar ningún tipo de extracción de los metales de las pieles o de las semillas. De todos modos, estas muestras seguirán siendo analizadas durante un periodo de fermentación de hasta 2 años para detectar cualquier pequeña diferencia que pudiera ocurrir durante este tiempo.

2.- Estudios electroquímicos

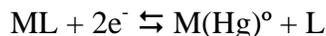
2.1.- Ligando modelo: Catequina



Esquema 1: Estructura de la catequina utilizada para este estudio: (+)-catequina:2R,3S

conocida del ligando modelo en la celda electroquímica y adicionando cantidades crecientes de Zn y Cu a la disolución. Después de esperar un tiempo de equilibrado adecuado al metal objeto de estudio, se procedió a la preconcentración del metal durante 60 s con el objeto de obtener un depósito de metal amalgamado sobre la superficie del electrodo de mercurio. A continuación, se aplicó un barrido de potencial en sentido positivo que provocó la oxidación y redisolución del metal, que es la parte del procedimiento que permite evaluar el proceso de complejación. Cuando el ligando está en exceso y se añade una determinada cantidad de metal, tiene lugar un proceso de equilibrado inicial entre ambos, de manera que la acumulación electroquímica del metal en la superficie del electrodo puede describirse como un

proceso competitivo con el de formación del complejo:



Las señales voltamétricas registradas a partir de este análisis son procesadas de acuerdo a los algoritmos de Langmuir y Scatchard³¹ y si se consigue linealizar los datos obtenidos a partir de la valoración con Zn y Cu, esto querrá decir que nos encontramos frente a complejos disociables de relación estequiométrica 1:1 M:L.

Los primeros experimentos realizados para estudiar la redisolución de Zn después de adiciones sucesivas de cantidades conocidas de metal, no dieron buenas curvas de valoración con ninguno de los tres ligandos modelo, lo que sugirió que la formación de los complejos Zn-ligando requiere un cierto tiempo de equilibrado después de la adición del metal y antes de realizar su preconcentración sobre mercurio. Se observó que es necesario esperar tiempos de equilibrado relativamente altos (hasta 30 min) para poder estudiar electroquímicamente la competición entre el ligando y el mercurio por el Zn. Por otro lado, los estudios realizados con Cu mostraron que el metal forma complejos rápidamente con los ligandos elegidos, aplicándose un tiempo de equilibrado de no más de 3 minutos, en todos los casos.

La figura 2 muestra las curvas de valoración obtenidas para catequina con Zn y Cu, en tampón acetato a pH 4.0. En ambos casos se observan dos tramos lineales que corresponden a catequina en exceso y al exceso de Zn o Cu respectivamente. La concentración a partir de la cual tiene lugar este cambio de pendiente corresponderá a la cantidad de metal necesario para saturar completamente los sitios de unión de la catequina. Como puede verse en la figura 1, la concentración condicional de Zn ($[Zn]'$) que provoca la saturación del ligando es de aproximadamente $1.50 \mu M$, resultado que se aproxima mucho a la cantidad de catequina introducida en la celda electroquímica ($1.45 \mu M$). De igual manera, en el caso del Cu se introdujo en la celda una concentración de catequina de $0.58 \mu M$ y la curva de valoración para este metal cambia su pendiente para un valor de $0.60 \mu M$. Estos resultados parecen indicar que la estequiometría de los complejos formados con catequina en estas condiciones es de 1:1.

Para confirmar esta hipótesis se procesaron todos los resultados obtenidos empleando por un lado el algoritmo de linealización de Langmuir³¹, teóricamente deducido y aplicable sólo a estequiometrías 1:1 y, por otro lado el de Scatchard que, siendo aplicable nuevamente al mismo tipo

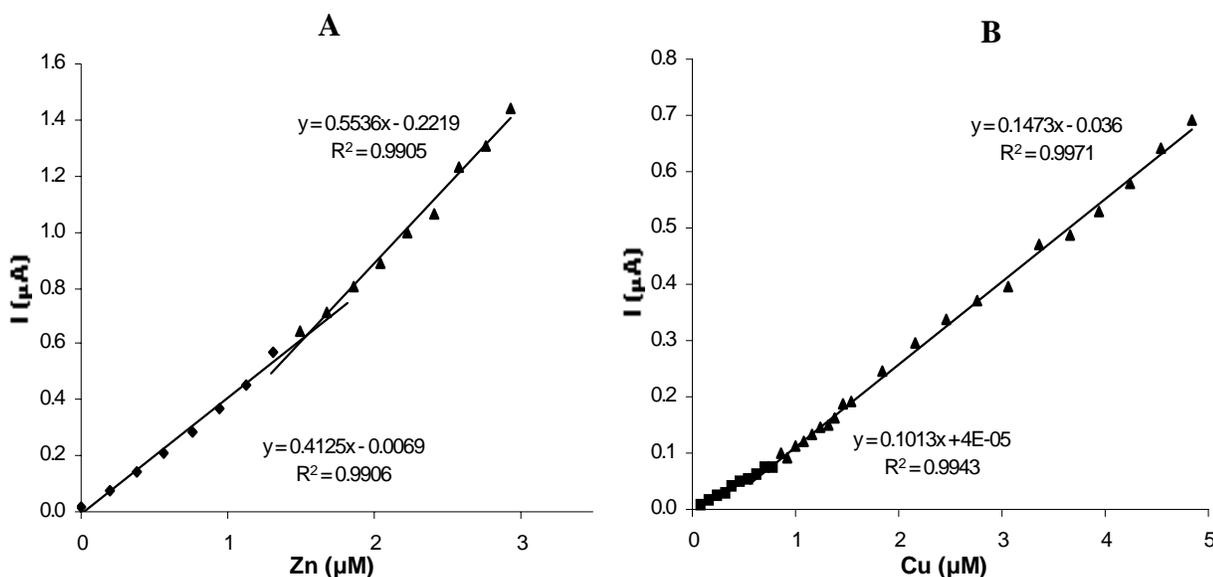


Figura 2.- Curvas de valoración obtenidas para dos disoluciones de catequina preparadas en tampón acetato a pH 4, a las que se ha añadido cantidades crecientes de: A) Zn ([catequina]= $1.45 \mu M$); B) Cu ([catequina]= $0.58 \mu M$)

de estequiometrías, es capaz de detectar hasta dos poblaciones distintas de ligandos. En ambos casos se obtuvieron líneas rectas para los dos metales, lo que confirma la formación de complejos 1:1 en las respectivas disoluciones. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2, siendo reseñable la similitud existente entre los datos calculados a partir de ambos algoritmos.

Tabla 2.- Constantes condicionales de formación ($\log K'_{ML}$) calculadas a partir de los algoritmos de Langmuir y Scatchard para Zn y Cu.

	Langmuir	Scatchard
Zn	5.52	6.05
Cu	4.55	4.65

Con el objeto de verificar que los metales en disolución de tampón acetato a pH 4.0 se depositan libremente sobre el electrodo de mercurio, se registraron curvas de valoración en ausencia de ligandos (resultados no mostrados) para Zn y Cu. Los valores de las pendientes de las curvas obtenidas fueron muy similares a los correspondientes a las segundas pendientes registradas en presencia de catequina, lo que implica que el anión acetato presente en la disolución tampón no interviene en la preconcentración de los metales sobre el electrodo, es decir, que el acetato no actúa como ligando para

Zn o Cu, como había sido mencionado anteriormente³². Por otro lado, la estructura de la catequina muestra la presencia de una gran cantidad de grupos OH, susceptibles de ser protonados o desprotonados en función del pH de la disolución. Los estudios mostrados hasta este momento, fueron realizados a pH 4.0, que es el pH natural del vino, por lo que las estequiometrías de complejación calculadas anteriormente sí serían asimilables a muestras reales de vino. Sin embargo, se ha considerado de interés realizar un estudio preliminar similar a los realizados hasta este momento, pero a un pH de 8. El objetivo fue comprobar si la posible desprotonación y la consiguiente modificación en la estequiometría de los complejos puede ser monitorizada electroquímicamente.

La figura 3 muestra las curvas de valoración registradas en una disolución de tampón fosfato a pH 8, en las que las concentraciones de ligando empleadas fueron de 1 μM para el caso del Zn y de 0.6 μM para las adiciones de Cu.

Los resultados mostrados por dichas curvas de valoración indican una diferente relación estequiométrica entre el ligando y los metales añadidos, si se comparan dichos resultados con los obtenidos a pH 4. Así, la curva de valoración registrada para el Zn, muestra el punto de corte entre ambas pendientes a un valor de aproximada-

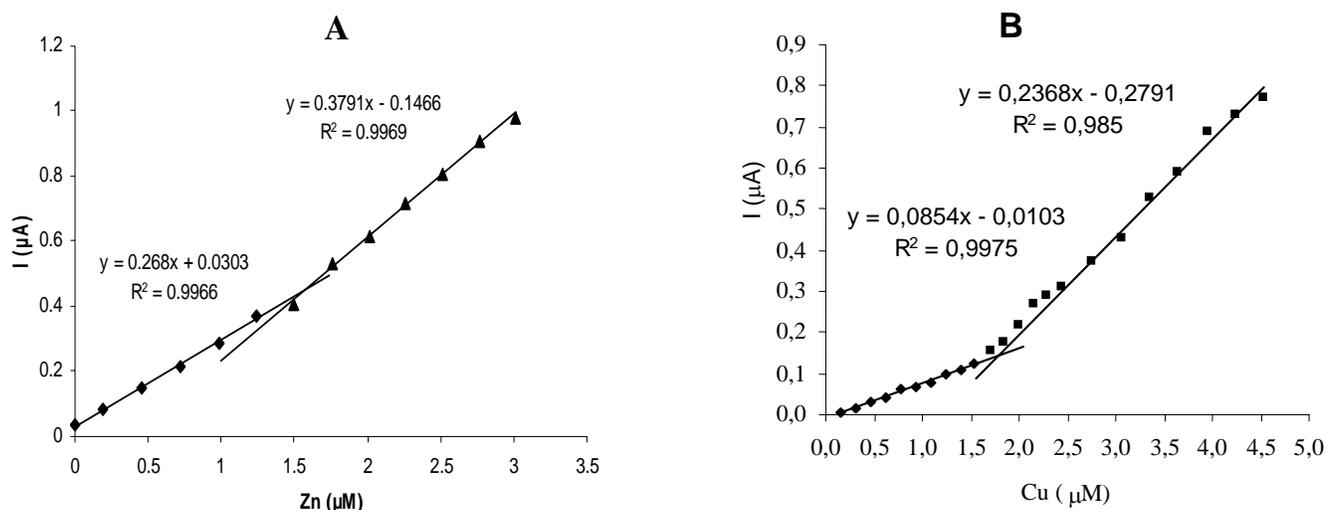


Figura 3.- Curvas de valoración obtenidas para dos disoluciones de catequina preparadas en tampón fosfato a pH 8, a las que se ha añadido cantidades crecientes de: A) Zn [catequina]=1 μM ; B) Cu [catequina]=0.6 μM

mente $1.5 \mu\text{M}$, lo que quiere decir que es necesario añadir esa concentración de Zn para saturar completamente una concentración de catequina de $1 \mu\text{M}$, lo que implica que, en este caso la relación molar Zn:catequina es de 3:2. En el caso del Cu, los resultados muestran una situación similar puesto que es necesario añadir una concentración de casi $1.8 \mu\text{M}$ para saturar una totalmente una concentración de catequina de $0.6 \mu\text{M}$, lo que indica que la relación molar entre ambos es, en este caso, de 3:1.

Este incremento en la presencia de número de moléculas de metal en los complejos formados a este pH, puede explicarse por la más que probable desprotonación sufrida por los grupos OH presentes en este polifenol, como ya ha sido indicado en la literatura¹. La principal consecuencia de esta desprotonación será la generación de una mayor cantidad de puntos en los que habrá acumulada una cierta densidad de carga negativa (aparición de grupos carbonilo por la reordenación de los dobles enlaces de la molécula) que los hará más atractivos a los cationes presentes en la disolución.

Estos resultados demuestran que la técnica empleada es lo suficientemente sensible como para poder detectar variaciones estructurales de los ligandos, inducidas -en este caso- por la variación del pH. Esta será, por lo tanto, la principal justificación de las diferencias encontradas entre las estequiometrías en función del pH. En el caso de las medidas realizadas a pH 4, el hecho de que la molécula de catequina compleje únicamente un átomo de Zn o de Cu es debido a la disposición adoptada por la molécula orgánica y el átomo de metal. Estudios teóricos realizados anteriormente por Esparza y colab.³³ demostraron que la molécula de catequina, adopta a pH 4 una disposición plegada que es capaz de albergar en su interior únicamente un átomo de Zn o Cu. Sin embargo, la aparición de zonas de densidad de carga negativa generada por la desprotonación de los grupos OH a pH 8, provocará fuerzas de repulsión entre las distintas partes de la molécula, impidiendo un plegamiento similar al encontrado a pH 4, lo que permite la complejación de más de un átomo de metal.

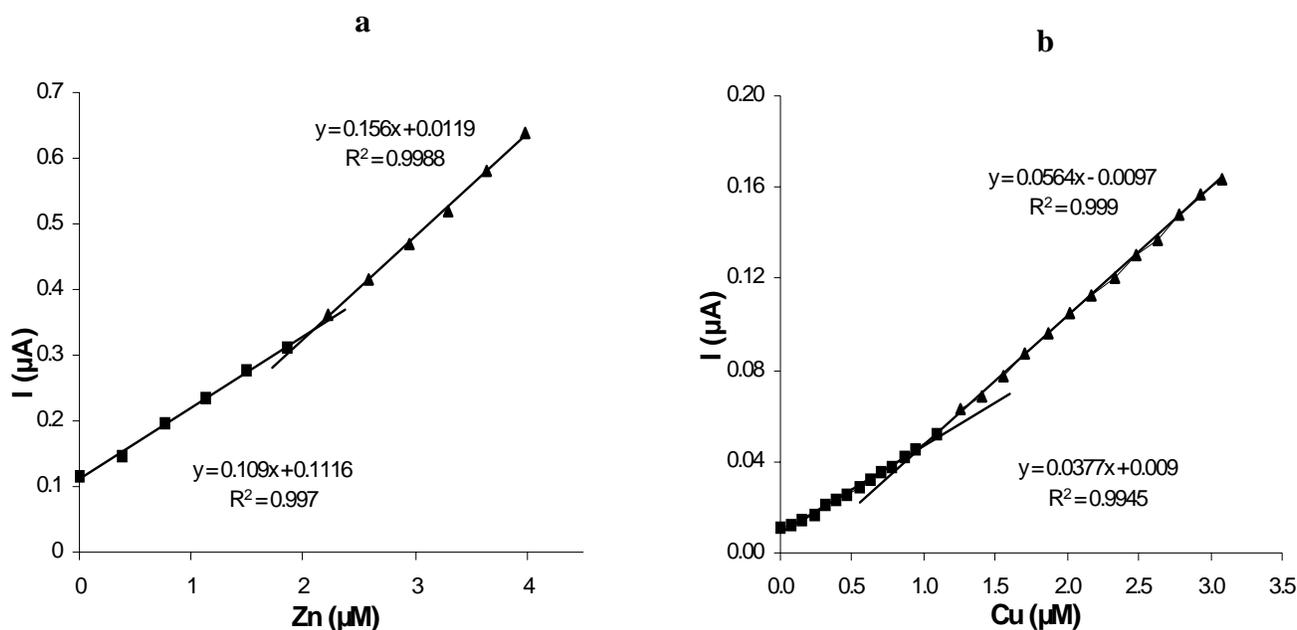


Figura 4.- Curvas de valoración obtenidas para una muestra de vino preparada a dilución 1:10 con tampón acetato a pH 4, a las que se ha añadido cantidades crecientes de: a) Zn; b) Cu. La muestra de vino corresponde al día 21 de fermentación.

2.2.- Muestra de vino

Una vez conocido el comportamiento electroquímico del ligando modelo frente a la presencia de metales como Zn y Cu, se decidió repetir el estudio con una muestra de vino real. Para ello se emplearon las condiciones electroquímicas optimizadas para la catequina para ambos metales y se aplicaron a una muestra de vino correspondiente al día 21 de fermentación que fue diluida 10 veces con el tampón acetato a pH 4. La razón por la que se empleó este tampón es que no es posible medir directamente muestras de vino concentradas, debido a la gran cantidad de materia orgánica que contienen y que se adsorbe rápida e irreversiblemente sobre la superficie del electrodo de mercurio. Se ha comprobado que una dilución 1:10 es suficiente para poder registrar curvas de valoración mediante la adición de metales; por otra parte, la utilización de un medio tamponado a un pH próximo al del vino no afecta a los equilibrios naturales de la muestra, como ha podido comprobarse anteriormente²⁹.

Al igual que se hizo con la catequina, se prepararon dos muestras de vino a dilución 1:10, a las que se adicionaron Zn y Cu respectivamente. La figura 4 muestra el aspecto de dichas curvas de valoración. A la vista de las curvas, es sorprendente verificar que, a pesar de la complejidad química de las muestras y de la cantidad de posibles ligandos naturales que puede haber presentes, ambas muestras se comportan de forma muy similar a las muestras sintéticas estudiadas anteriormente, presentando dos tramos rectos de distinta pendiente, cuyo punto de intersección corresponde nuevamente a la concentración de metal que es necesario añadir para saturar totalmente la capacidad complejante de los ligandos presentes. Estos resultados hacen suponer que la mayoría de los ligandos complejantes presentes en los vinos son compuestos orgánicos muy similares a la catequina que -no en vano- es el polifenol más abundante en este tipo de matrices.

Conclusiones

De entre todos los metales presentes en un vino se han escogido cuatro (Zn, Cu, Fe y Mn) y cuantificado a lo largo del proceso de fermentación. A partir de estos resultados, se pueden establecer dos tipos de comportamientos: el de Cu y Fe, cuya concentración disminuye ostensiblemente a lo largo de los primeros días de fermentación (posiblemente debido a reacciones de precipitación), y el de Zn y Mn, cuyas concentraciones se mantienen prácticamente constantes a lo largo de los 345 días de vinificación estudiados.

El estudio electroquímico realizado con la catequina, cuya estructura es muy similar a la del polifenol más abundante en el vino, ha permitido determinar que, al pH del vino, ésta molécula forma complejos con Zn y Cu de estequiometría 1:1, mientras que a pH 8 se producen cambios en su estructura que alteran dicha estequiometría, que pasan a ser 3:2 y 3:1, respectivamente. La voltamperometría de redisolución anódica ha demostrado ser suficientemente sensible como para detectar dichos cambios estequiométricos.

Referencias

- 1.- "Elaboración y crianza del vino tinto". F. Zamora. Mundi-Prensa. Barcelona (2003).
- 2.- "El vino, su composición y nuestros sentidos". J. Cacho. Zaragoza (2003).
<http://www.unizar.es/acz/02AcademicosNumerarios/ Discursos/Cacho.pdf>.
- 3.- "Tratado de enología. (Tomo II). Química del vino, estabilización y tratamientos. P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu. Hemisferio Sur. Buenos Aires (2003).
- 4.- "Tratado de enología. Vols. 1 y 2". J. Hidalgo Togados. Mundi-Prensa. Barcelona (2003).
- 5.- "Química enológica". L. Usseglio-Tomasset. Mundi-Prensa. Barcelona (1998).
- 6.- "Fractionation and speciation of Cu, Zn and Fe in wine samples by atomic absorption spectrometry". I. Karadjova, B. Izgi. Spectrochim. Acta, Part B, 57 (2002) 581.

- 7.- "Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids". S.A.B.E. van Acker, G.P. van Balen, D.J. van der Berg, A. Bast, W.J.F. van der Vijgh. *Biochem. Pharmacol.*, 56 (1998) 935.
- 8.- "A quantitative investigation of metal – anthocyanin complexes in aqueous solution". O. Dangles, M. Elhabiri, R. Brouillard. *Proceedings of the Polyphenols. Palma de Mallorca (España)* (1994).
- 9.- "Metal Chelation of Polyphenols". R.C. Hider, Z.D. Liu, H.H. Khodr, *Meth. Enzymol.*, 335 (2001) 191.
- 10.- "El color y la composición en polifenoles de los vinos tintos varietales de Castilla-La Mancha (España)". R.M. Chicón, E. Sánchez-Palomo, *Afinidad LIX* (500) (2002) 435.
- 11.- "Evolution of metal and polyphenol content over one year period of vinification: Sample fractionation and correlation metals-anthocyanins". I. Esparza, Í. Salinas, I. Caballero, C. Santamaría, I. Calvo, J.M. García-Mina, J.M. Fernández. *Anal. Chim. Acta*, 524 (1/2) (2004) 215.
- 12.- "Trace elements in wine from Croatia". B. Sebecic, D. Pavisic-Strache, I. Vedrına Dragojevic. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 94 (10) (1998) 341.
- 13.- "The importance of metallic elements in wine. A literature survey". C. Fernández Pereira. *Z. Lebensm. Unters Forsch.*, 186 (1988) 295.
- 14.- "Determination of metals in wine with atomic spectroscopy (flame - AAS, GF - AAS and ICP - AES); a review". M. Aceto, O. Abollino, M.C. Bruzzoniti, E. Mentasti, C. Sarzanini, M. Malandrino. *Food Additives and Contaminants*, 19 (2) (2002) 126.
- 15.- "Survey of 22 mineral elements in wines from Trentino (Italy) using ICP - OES". R. Larcher, G. Nicolini. *Ital. J. Food Sci.* 13 (2) (2001) 233.
- 16.- "Micro-element analysis in wine and grapes" H. Eschnauer, R. Neeb, *Wine Analysis*, Ed. H.F. Linskens y J.F. Jackson, Springer, Berlín (1988).
- 17.- "Characterisation of Galician (NW Spain) Ribeira Sacra wines using pattern recognition analysis". S. Rebolo, R.M. Peña, M.J. Latorre, S. García, A.M. Botana, C. Herrero. *Anal. Chim. Acta*, 417 (2000) 211.
- 18.- "Instrumental and sensory analysis of Greek wines; implementation of principal component analysis (PCA) for classification according to geographical origin". S. Kallithraka, I.S. Arvanitoyannis, P. Kefalas, A. El Zajouli, E. Soufleros, E. Psarra. *Food Chem.*, 73 (2001) 501.
- 19.- "Tratado de enología. Ciencias y técnicas del vino. (Tomo II)". J. Ribéreau-Gayón, E. Peynaud, P. Ribéreau-Gayón, P. Sudraud. *Hemisferio Sur*, Buenos Aires (1989).
- 20.- "Tratado de enología. Ciencias y técnicas del vino. (Tomo I)". J. Ribéreau-Gayón, E. Peynaud, P. Sudraud, P. Ribéreau-Gayón. *Hemisferio Sur*, Buenos Aires (1980).
- 21.- "Studies on Fe complexes produced by yeast. V. role of the ligand in Fe absorption from Fe (II) – Oligosaccharide complex". Z.J. Suturovic, N.J. Marjanovic. *Nahrung*, 42 (1) (1998) 36.
- 22.- "Determination of cadmium, lead and copper in wine bby potentiometric stripping analysis". P. Ostapeczuk, H.R. Eschnauer, G.R. Scollary. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 358 (1997) 723.
- 23.- "Determination of heavy metals in wines by anodic stripping voltammetry with thick - film modified electrode". K.Z. Brainina, N.Y. Stozhko, G.M. Belysheva, O.V. Inzhevatova, L.I. Kolyadina, C. Cremisini, M. Galletti. *Anal. Chim. Acta*, 514 (2004) 227.
- 24.- "Electrochemical studies of complexation of Pb in red wines". M.T. Vasconcellos, M. Azenha, V. de Freitas. *Analyst*, 125 (2000) 743.
- 25.- "Multiple standard addition with latent variables (MSALV): Application to the determination of copper in wine by using differential- pulse anodic stripping voltammetry". A. Herrero, M.C. Ortiz, J. Arcos, J. López-Palacios, L. Sarabia. *Anal. Chim. Acta*, 293 (1994) 277.

26.- "Study of lability of heavy metals in wines with wines with different degrees of aging through differential pulse anodic stripping voltammetry". M.T. Arcos, M.C. Ancín, J.C. Echeverría, A. González, J.J. Garrido. *J. Agric. Food Chem.*, 41 (1993) 2333.

27.- "Influence of prefermentation clarification on heavy metal lability in Garnacha must and rosé wine using differential pulse anodic stripping voltammetry". J. Garrido, B. Ayestarán, P. Fraile, C. Ancín. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (1997) 2843.

28.- "Recherches spectrophotométriques sur la couleur des vins". A. Boutaric, L. Ferre, M. Roy. *J. Annal. Falsific.*, 30 (1937) 196.

29.- "Chromatic characterisation of three consecutive vintages of *Vitis vinifera* red wine. Effect of dilution and iron addition". I. Esparza, C. Santamaría, J.M. Fernández. *Anal. Chim. Acta* 563 (2006) 331.

30.- "Analytical Performance of Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry (Inductively coupled plasmas in Analytical Atomic Spectrometry)". M. Thompson, R.M. Barnes, Ed. Akbar Montaser, D.W. Golightly. VCH Publishers, New York, (1992).

31.- "Determination of complexing capacities of ligands in natural waters and conditional stability constants of the copper complexes by means of manganese dioxide". C.M.G. van den Berg, J.R. Kramer. *Anal. Chim. Acta*, 106 (1979) 113.

32.- "A study of heavy metal complexation in grape juice". Í. Salinas, I. Esparza, S. Gómez, C. Santamaría, J.M. Fernández, *Electroanalysis*, 17 (2005) 469.

33.- "Electrochemical and theoretical complexation studies for Zn and Cu with individual polyphenols". I. Esparza, Í. Salinas, C. Santamaría, J.M. García-Mina, J.M. Fernández. *Anal. Chim. Acta*, 543 (2005) 267.

NOTA: El trabajo aquí reportado es un extracto de un estudio más amplio correspondiente a las citas 11 y 33.