



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Inorgánica y Analítica

Laboratorio de Radicales Libres y Antioxidantes

**EFFECTO DEL pH SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
EN VINO MODELO: INTERACCIÓN ENTRE HIERRO Y
COMPUESTOS FENÓLICOS.**

Memoria para obtener el título de Química

Estefanía Paz Salinas Flores

Directores de Memoria:

Dra. María Carolina Zúñiga López.

Dr. Víctor Felipe Laurie Gleisner.

Santiago de Chile, 2017.

A mis padres <3

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a los profesores del Laboratorio de Radicales Libres y Antioxidantes, Dra. María Carolina Zúñiga y Dr. Claudio Olea, por su constante apoyo, disposición a ayudarme en esta memoria, preocupación por sus alumnos y almuerzos alegres. Gracias por permitirme ser parte de su laboratorio.

Agradezco a mis padres, Beatriz y Luis, por mover montañas por mi educación desde pequeña, por apoyarme incondicionalmente cuando sufría con los ramos de la Universidad, por crear un hermoso hogar rebotante de amor gatuno y por contenerme en los momentos difíciles. Gracias a mis hermanos por ser como son, por todas esas risas, tallas y juegos que hemos compartido.

Gracias a mis amigos incondicionales, Micky, Camilo y Cintia, lo mejor de la Universidad fue haberlos conocido, gracias por los estudios grupales con plumones voladores del dosmilnueve, gracias por su ayuda académica, consejos de vida, mensajes, visitas y paseos a lo largo de los años. Son bacanes.

A los compañeros de laboratorio, Gaby, Manuel, Mauricio y Bea por hacer la parte experimental de mi tesis más llevadera con buenos momentos de desestrés y chocolates.

Gracias a Perla, Rubí, Charlotte, Lola, Baby, Sherlock y Jack por haber sido y ser mis beibis.

Y, por último, gracias a los profesores de Enseñanza Media del Liceo 1 por educarme en un ambiente donde las mujeres éramos capaces de tener el futuro que nos propusiéramos (*“Que nadie les diga que por ser mujeres no pueden ser Ingenieras, ustedes pueden estudiar la carrera que quieran...”*).

ABREVIATURAS

AAPH: 2,2'-Azo-bis(2-metilpropionamidina) dihidrocloruro

AG: Ácido gálico.

CA: Capacidad antioxidante.

CAF: Ácido cafeico.

CAT: Catequina.

DPPH: Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo.

EAG: Equivalentes de ácido gálico.

ET: Mecanismo antioxidante de transferencia electrónica.

FC: Ensayo de Folin-Ciocalteu.

HAT: Mecanismo antioxidante de transferencia de átomo de hidrógeno.

ORAC-FL: Capacidad de absorción de radicales oxígeno, utilizando fluoresceína como sonda.

PT: Polifenoles totales.

RL: Radical libre.

ROO[•]: Radical peroxilo.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

Vino CR: Vino a pH 2,3 y ≈ 0 ppm de hierro.

Vino SR: Vino a pH 3,4 y ≈ 1 ppm de hierro.

TABLA DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	VINO	1
1.2	COMPONENTES DEL VINO	2
1.2.1	Compuestos fenólicos	2
1.2.2	Metales de transición	5
1.2.2.1	Cobre	6
1.2.2.2	Hierro	7
1.3	ACIDEZ Y PH EN VINOS	8
1.4	OXIDACIÓN DEL VINO	9
1.5	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	11
1.6	MECANISMOS ANTIOXIDANTES	13
1.7	MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	14
2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
3	HIPÓTESIS	16
4	OBJETIVOS	16
4.1	OBJETIVOS GENERALES	16
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
5	MATERIALES Y MÉTODOS	17
5.1	MATERIALES	17
5.1.1	Muestras de vino	17
5.2	REACTIVOS	18
5.3	MÉTODOS	19
5.3.1	Métodos para análisis en vino modelo	19
5.3.1.1	Preparación de vino modelo	19
5.3.1.2	Diseño experimental basado en Screening factorial 2 ³	19
5.3.1.3	Capacidad antioxidante	22
5.3.1.3.1	Determinación de la capacidad antioxidante por medio de ensayo DPPH (Porcentaje de inhibición del radical)	22
5.3.2	Métodos para análisis en vinos reales	22
5.3.2.1	Determinación de polifenoles totales por medio de ensayo Folin-Ciocalteu	22
5.3.2.1.1	Curva de Calibración de ácido gálico	22
5.3.2.1.2	Ensayo de evaluación del contenido de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu ²³	23
5.3.2.2	Ajustes de pH y concentración de Hierro en vinos	24
5.3.2.2.1	Determinación de pH inicial y posterior ajuste de este en vinos reales	24
5.3.2.2.2	Ajuste de concentración de hierro en vinos reales	24
5.3.2.3	Capacidad antioxidante	25
5.3.2.3.1	Determinación de la capacidad antioxidante por medio del ensayo DPPH (Porcentaje de inhibición del radical)	25
5.3.2.3.2	Determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo ORAC-FL	25

5.3.3	<i>Análisis Estadístico</i>	26
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
6.1	VINO MODELO	27
6.1.1	<i>Capacidad antioxidante de vinos modelo por medio de ensayo DPPH</i>	27
6.1.1.1	Vino modelo con ácido gálico (AG)	27
6.1.1.2	Vino modelo con Catequina (CAT)	29
6.1.1.3	Vino modelo con ácido cafeico (CAF)	33
6.1.1.4	Determinación de la capacidad antioxidante de vinos modelo luego de 20 días. 40	
6.2	VINOS REALES.....	41
6.2.1	<i>Determinación de polifenoles totales por medio de ensayo Folin-Ciocalteu</i>	43
6.2.2	<i>Determinación de capacidad antioxidante inicial de los vinos SR y vinos CR</i> . 44	
6.2.3	<i>Capacidad antioxidante de vinos dopados con hierro</i>	46
6.2.4	<i>Capacidad antioxidante de vino SR y vino CR luego de modificado su pH</i>	49
7	CONCLUSIONES	54
8	REFERENCIAS	57
9	ANEXOS	65

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CONTENIDO DE METALES DE LOS VINOS*	18
TABLA 2. PROPIEDADES DE LOS VINOS ESTUDIADOS*	18
TABLA 3. FACTORES EXPERIMENTALES Y SUS RESPECTIVOS VALORES MÁXIMOS Y MÍNIMOS.	20
TABLA 4. MODELO EXPERIMENTAL PARA VINO MODELO CON ÁCIDO GÁLICO COMO COMPUESTO FENÓLICO.	21
TABLA 5. MODELO EXPERIMENTAL PARA VINO MODELO CON CATEQUINA COMO COMPUESTO FENÓLICO.	21
TABLA 6. MODELO EXPERIMENTAL PARA VINO MODELO CON ÁCIDO CAFEICO COMO COMPUESTO FENÓLICO.	21
TABLA 7. DILUCIONES PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO.	23
TABLA 8. SOLUCIONES DE VINO PARA ORAC-FL.	26
TABLA 9. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE INICIAL DE VINO MODELO CON ÁCIDO GÁLICO COMO COMPUESTO POLIFENÓLICO.	27
TABLA 10. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE INICIAL DE VINO MODELO CON CATEQUINA COMO COMPUESTO POLIFENÓLICO.	29
TABLA 11. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE INICIAL DE VINO MODELO CON ÁCIDO CAFEICO COMO COMPUESTO POLIFENÓLICO.	33
TABLA 12. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE INICIAL DE VINO MODELO CON ÁCIDO CAFEICO COMO COMPUESTO POLIFENÓLICO Y HIERRO II.	35
TABLA 13. RESUMEN COMPARATIVO DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE SOLUCIONES DE VINO MODELO CON LOS DIFERENTES COMPUESTOS POLIFENÓLICOS AL DÍA INICIAL Y LUEGO DE 20 DÍAS.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA QUÍMICA BASE DE LOS FLAVONOIDES.	2
FIGURA 2. ESTRUCTURA BÁSICA DE ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS Y SUS DERIVADOS DE ACUERDO A LA SUSTITUCIÓN.....	4
FIGURA 3. FUENTES DE METALES EN VINO ENDÓGENAS (LÍNEA SÓLIDA) Y EXÓGENA (LÍNEA PUNTEADA). (POHL, 2007).....	5
FIGURA 4. MECANISMO DE OXIDACIÓN NO ENZIMÁTICA DEL VINO VÍA REDUCCIÓN DE OXÍGENO CATALIZADA POR METAL Y POSTERIOR OXIDACIÓN DE ETANOL (PROPUESTO POR ELIAS ET AL., 2009).....	10
FIGURA 5. CARTA DE PARETO PARA ÁCIDO GÁLICO A TIEMPO CERO. (DONDE: A, PH; B, CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO; C: CONCENTRACIÓN DE HIERRO (III); AB, BC, AC INTERACCIONES). ADEMÁS, SE PRESENTA LA ECUACIÓN SIMPLIFICADA DEL MODELO.	27
FIGURA 6. CARTA DE PARETO PARA CATEQUINA A TIEMPO CERO. (DONDE: A, PH; B, CONCENTRACIÓN DE CATEQUINA; C: CONCENTRACIÓN DE HIERRO (III); AB, BC, AC INTERACCIONES). ADEMÁS, SE PRESENTA LA ECUACIÓN SIMPLIFICADA DEL MODELO.	30
FIGURA 7. CARTA DE PARETO PARA ÁCIDO CAFEICO A TIEMPO CERO. (DONDE: A, PH; B, CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO CAFEICO; C: CONCENTRACIÓN DE HIERRO (III); AB, BC, AC INTERACCIONES). ADEMÁS, SE PRESENTA LA ECUACIÓN SIMPLIFICADA DEL MODELO.	34
FIGURA 8. CARTA DE PARETO PARA ÁCIDO CAFEICO A TIEMPO CERO. (DONDE: A, PH; B, CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO CAFEICO; C: CONCENTRACIÓN DE HIERRO (II); AB, BC, AC INTERACCIONES). ADEMÁS, SE PRESENTA LA ECUACIÓN SIMPLIFICADA DEL MODELO.	36
FIGURA 9. DIAGRAMA DE AJUSTE DE LOS VINOS: (A) AJUSTE DE PH, (B) AJUSTE DE CONTENIDO DE HIERRO.....	42
FIGURA 10. CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO.	43
FIGURA 11. POLIFENOLES TOTALES POR MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU DE LOS VINOS SR (1 PPM DE HIERRO, PH 3,4) Y CR (\approx 0 PPM DE HIERRO, PH 2,3).....	43
FIGURA 12. ORAC-FL DE VINOS SR (1 PPM DE HIERRO, PH 3,4) Y CR (\approx 0 PPM DE HIERRO, PH 2,3).	45
FIGURA 13. DPPH DE VINOS SR (1 PPM DE HIERRO, PH 3,4) Y CR (\approx 0 PPM DE HIERRO, PH 2,3).	45
FIGURA 14. ORAC-FL DE VINOS SR Y VINOS CR A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE HIERRO.....	47
FIGURA 15. DPPH DE VINOS SR Y VINOS CR A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE HIERRO.....	47
FIGURA 16. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE MÉTODO ORAC-FL DE VINOS DE ALTO HIERRO A TIEMPO INICIAL, SIETE Y VEINTIÚN DÍAS MODIFICADOS A PH 3,0; 3,4 Y 4,0.....	49

FIGURA 17. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE MÉTODO ORAC-FL DE VINOS DE BAJO HIERRO A TIEMPO INICIAL, SIETE Y VEINTIÚN DÍAS MODIFICADOS A PH 3,0; 3,4 Y 4,0.....	49
FIGURA 18. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE MÉTODO DPPH DE VINOS SR A TIEMPO INICIAL, SIETE Y VEINTIÚN DÍAS MODIFICADOS A PH 3,0; 3,4 Y 4,0.....	50
FIGURA 19. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE MÉTODO DPPH DE VINOS CR A TIEMPO INICIAL, SIETE Y VEINTIÚN DÍAS MODIFICADOS A PH 3,0; 3,4 Y 4,0.....	51

RESUMEN

Chile es uno de los diez mayores productores de vino en el mundo y el cuarto exportador a nivel global, alcanzando una producción de más de mil millones de litros en el año 2016. Para la elaboración de vinos de calidad, existen diversas variables de importancia tales como la temperatura de producción, los niveles de exposición al oxígeno, el pH, el contenido de compuestos fenólicos, metales, entre otros. De hecho, el vino (particularmente el vino tinto) es un producto reconocido por su alta concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante (CA), los que se vinculan no solo a determinadas propiedades físico-químicas y sensoriales, sino que a los potenciales efectos beneficiosos sobre la salud derivados de su consumo moderado. En este trabajo, se realizó un análisis para evaluar la contribución relativa de diversos constituyentes del vino a la capacidad antioxidante. Las variables en estudio fueron: pH, hierro y concentración de ácido galico (AG) o catequina (CAT) o ácido cafeico (CAF) según correspondiera, y los resultados fueron analizados mediante un diseño Screening Factorial 2^3 con el objetivo de obtener la capacidad antioxidante por el método Ensayo de DPPH. Para cada solución modelo donde los compuestos fenólicos fueron AG y CAT, se observó que solo estos generaron una contribución significativa y positiva a la capacidad antioxidante, resultando no significativas las variables: pH, hierro y sus interacciones. En cambio, para la solución modelo conteniendo CAF se obtuvo que la concentración de Fe (III), fue la única variable significativa, con contribución positiva a la CA, probablemente debido a la formación de ácido caftárico, el cual podría coordinar al Fe (III). De acuerdo a estos últimos resultados, se realizó un cuarto experimento, donde se utilizó Fe (II) en vez de Fe (III), en las mismas condiciones del experimento anterior, y se obtuvo un resultado diferente: las variables pH, CAF y la interacción pH-Fe(II) resultaron significativas, la primera con contribución negativa y las dos restantes con contribución positiva. El pH podría afectar la cupla redox Fe(II)/Fe(III) y esto influir en la coordinación del ácido caftárico.

Para comprobar el estudio anterior, se realizó otro experimento para evaluar la CA, pero en vino tinto real. Para este efecto, se utilizó un tratamiento con resina de intercambio catiónico para analizar un mismo vino a diferentes pH y concentración

de hierro, de esta forma se obtuvo: un vino a pH 2,3 y $\approx 0 \text{ mg L}^{-1}$ de hierro (Vino CR) y un vino a pH 3,4 y $\approx 1 \text{ mg L}^{-1}$ de hierro (Vino SR). Mediante el método ORAC-FL, la CA inicial de ambos vinos disminuye en el tiempo, lo contrario se observó por el método DPPH, la CA aumentaba, probablemente por efecto de reacciones de copigmentación en el vino. Para estudiar el efecto del hierro se fortificó ambos vinos a una concentración de 5 mg L^{-1} de hierro (III), se obtuvo, inicialmente, que por ORAC-FL la capacidad antioxidante aumentó en comparación al vino sin dopar y, al transcurrir 21 días ocurría lo mismo. Por DPPH la capacidad antioxidante de los vinos fortificados fue menor frente a los no fortificados y esto se mantuvo en el tiempo. Respecto al estudio del efecto de pH en el vino, los resultados demostraron que el pH no tenía mayor incidencia en la capacidad antioxidante por el método ORAC-FL, probablemente debido a que este implica el uso de buffer a pH 7,4. Mediante DPPH se observó un aumento de la CA para vinos SR y CR a medida que aumentaba el pH en el rango $3,0 < \text{pH} < 4,0$ y, en el tiempo, sólo se observó un aumento de la CA en los vinos SR.

ABSTRACT

Chile is one of the ten wine-producing countries in the world and the fourth of wine-exporting countries, reaching a production of over a billion liters in 2016. In the production of quality wines there are many important variables such as oxygen exposure, pH, phenolic content, metals, among others. In fact, wine (red wine, particularly), is known for its high phenolic content and antioxidant capacity that are not just related to physicochemical and sensory properties but also to the potential beneficial effects on health derived from moderate consumption. In this research an analysis to evaluate the relative contribution of various constituents of the wine to the antioxidant capacity was performed. The variables under study were: pH, iron and gallic acid (AG) or catechin (CAT) or caffeic acid (CAF), and the results were analyzed through an Screening factorial 2^3 design with the goal to obtain the antioxidant capacity by DPPH. In the model wine solution with AG and CAT was observed that only these factors generated a significant and positive contribution to the antioxidant capacity resulting in non significant variables: pH, iron and their interactions. However, for the solution containing CAF, the Fe (III) concentration was the only significant variable, with a positive contribution to CA, probably due to the formation of caftaric acid, which could coordinate Fe (III). According to the latter results, a fourth experiment was performed, where Fe (II) was used instead of Fe (III), under the same conditions of the previous experiment, and a different result was obtained: pH, CAF and the pH-Fe (II) interaction were significant, the first with negative contribution and the remaining two with a positive contribution. The pH could affect the Fe (II) / Fe (III) redox couple and this may influence the caftaric acid coordination.

To verify the previous study, another experiment was conducted to evaluate CA, but now in real red wine. For this purpose, a cation exchange resin treatment was used to obtain the same red wine at different pH and iron concentration: CR Wine (pH 2.3, $\approx 0 \text{ mg L}^{-1}$ iron), SR Wine (pH 3,4; $\approx 1 \text{ mg L}^{-1}$ iron). By ORAC-FL method, the initial CA of both wines decreased over time, on the other hand by the DPPH method was observed, the CA increased, possibly due to co-pigmentation reactions in wine. To

study the iron effect, both wines were fortified at a concentration of 5 mg L^{-1} of iron (III). Initially by ORAC-FL it was found that the antioxidant capacity increased compared to non-fortified wine, after 21 days the same result was obtained. By DPPH method the antioxidant capacity of fortified wines was lower compared to non-fortified wines and this was maintained over time too. Regarding the pH study effect in wine, the results showed that the pH had no higher incidence in the antioxidant capacity by the ORAC-FL, probably because this method involves the use of buffer at pH 7.4. DPPH increased the antioxidant capacity for SR and CR wines as the pH increased in the range $3.0 > \text{pH} > 4.0$ and, over time, only an increase in AC was observed in SR wines.

1 Introducción

1.1 Vino

Chile es uno de los diez mayores productores de vino a nivel mundial (Al Attrach, 2015). En la lista de los principales productos de exportación chilenos, el vino se encuentra en el quinto lugar, después del cobre, el molibdeno, el salmón y la celulosa. En el año 2016 la producción de vinos total en nuestro país alcanzó a más de mil millones de litros (SAG, 2016).

La composición química del vino influye en la calidad sensorial y en la capacidad del vino para resistir la oxidación y envejecimiento. Existen dos variables del proceso de vinificación que afectan la composición química, y que, a menudo, son pasadas por alto: el pH y el contenido de metales. El pH de las uvas y del vino es, probablemente, el parámetro más importante que afecta la calidad del producto final. Además, los metales tienen un rol importante al catalizar las reacciones de oxidación del vino.

Por otra parte, el vino es reconocido por su importante capacidad antioxidante debido a su contenido de compuestos polifenólicos. Estos han sido estudiados en numerosas investigaciones y muchos de ellos han sido implicados en la protección contra enfermedades como el cáncer y patologías cardiovasculares, mientras que algunos se ha visto que presentan una protección potencial contra la enfermedad de Alzheimer (Gorinstein et al., 1998; Nigdikar et al., 1998).

Dado que la matriz del vino es muy compleja, se ha optado por usar vinos modelo para estudiar la química de las reacciones de oxidación de compuestos presentes en él, además de diversos procesos. Varios trabajos de investigación han sido publicados usando este sistema, por ejemplo, para estudiar los efectos del pH sobre la astringencia de vinos (Kallithraka et al., 1997), la copigmentación en soluciones de vino modelo (Mirabel et al., 1999), interacciones entre dióxido de azufre, polifenoles y oxígeno en vino (Danilewicz, 2007), la reactividad de tioles volátiles con polifenoles en vino (Nikolantonaki et al., 2010), la acción antioxidante de componentes como el glutatión (Sonni et al., 2011), entre otros.

1.2 Componentes del vino

1.2.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son un grupo muy amplio e importante de sustancias que le confieren características y calidad al vino tinto. Estos pueden afectar la apariencia, sabor, gusto, aromas y propiedades anti microbianas del vino. También juegan un papel importante en la capacidad de tolerar la oxidación y envejecer apropiadamente (Haslam, 1998; Boulton et al., 1996). Aunque su origen es primordialmente desde la uva, cantidades pequeñas pueden ser extraídas desde barricas de madera (Jackson, 2008).

Químicamente, los fenoles son bencenos cíclicos con uno o más grupos hidroxilo unidos directamente al anillo. A pesar de que contienen grupos alcohol, no presentan propiedades típicas asociadas a los alcoholes alifáticos. La mayor cantidad de fenoles encontrados en vino pertenecen a la familia de los flavonoides y no-flavonoides.

Los **flavonoides** se caracterizan por un esqueleto C6-C3-C6, que comprende dos anillos fenólicos (anillos A y B) unidos por un anillo central de pirano. La enumeración de los átomos de carbono se indica en la Figura 1.

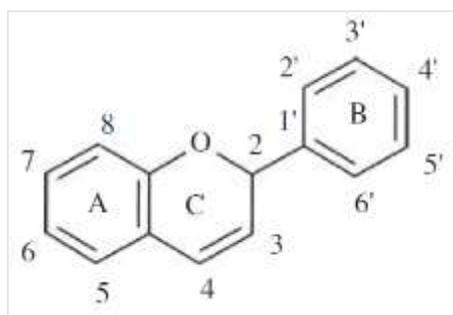


Figura 1. Estructura química base de los flavonoides.

Los flavonoides más comunes en vino son flavonoles, flavan-3-oles (catequinas) y antocianinas (en vinos tintos). Su función biológica consiste en una primera línea de defensa contra patógenos microbianos, plagas de insectos y herbívoros (Jackson, 2008).

Los flavonoides se pueden encontrar libres o polimerizados con otros flavonoides, azúcares, no flavonoides o una combinación de ellos. En uvas, la polimerización de catequinas produce una familia de polímeros llamadas procianidinas. Se puede encontrar (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epicatequinagalato y en menor cantidad (-)-epigallocatequina. Dentro del grupo de los flavonoides, la catequina es el compuesto fenólico monomérico más abundante en vinos tintos ($120\text{-}390\text{ mg L}^{-1}$) (Ojeda, 2007). Durante el envejecimiento del vino, la polimerización de flavonoides monoméricos y oligómeros genera nuevos taninos. En uvas, los flavonoides son sintetizados principalmente en la piel y las semillas, y en menor cantidad en los tallos. Flavonoles y antocianinas se localizan principalmente en la piel, mientras que flavan-3-oles y sus polímeros de procianidinas se sintetizan principalmente en semillas y tallos (Bourzeix et al., 1986).

Los flavonoides caracterizan a los vinos tintos mucho más que los vinos blancos. En vinos tintos constituyen más del 85% de contenido fenólico ($\geq 1000\text{ mg L}^{-1}$). En vinos blancos, los flavonoides constituyen menos del 20% ($\leq 50\text{ mg L}^{-1}$) (Jackson, 2008).

Por otra parte, los **no flavonoides** son, estructuralmente, más simples, pero su origen en el vino es más diverso. Esta familia de compuestos se divide en cuatro grupos: ácidos hidroxicinámicos, ácidos benzoicos, estilbenos y taninos hidrolizables.

Los **ácidos hidroxicinámicos** deben su nombre a la sustitución del grupo OH en el anillo aromático. Estos ácidos son los principales fenoles en el jugo de uva. Los ácidos hidroxicinámicos más comunes en uva y vino son tres: ácido cumárico (sustitución de fenol), ácido cafeico (sustitución de catecol), y el ácido ferúlico (sustitución 2-metoxifenol) (Figura 2). En vinos, el ácido cafeico se encuentra en concentraciones relativamente bajas tanto en tintos ($5\text{-}13\text{ mg L}^{-1}$), como en blancos ($1\text{-}4\text{ mg L}^{-1}$) (Frankel et al., 1995). La concentración de estos disminuye durante el desarrollo de la baya y se estabiliza en la madurez de esta (Romeyer et al., 1983).

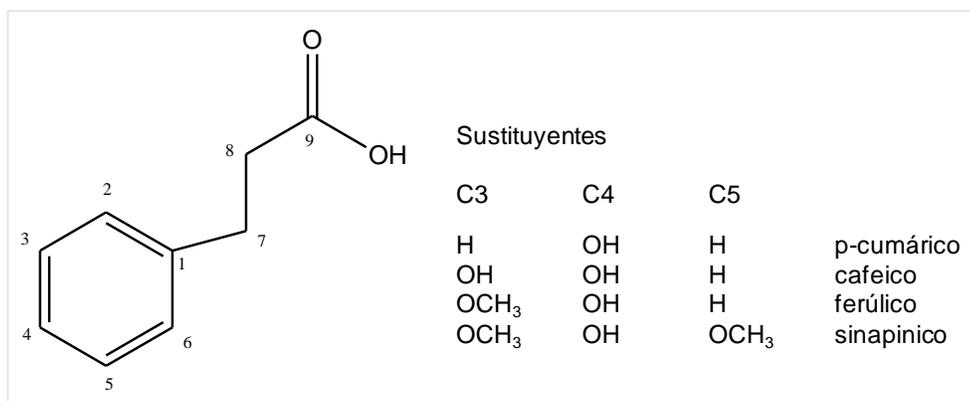


Figura 2. Estructura básica de ácidos hidroxicinámicos y sus derivados de acuerdo a la sustitución.

Dentro de los **ácidos benzoicos** de la uva se encuentra principalmente el ácido gálico, bajo la forma de éster de flavanol (galocatequinas, epigalocatequinas). En vinos tintos es uno de los compuestos fenólicos monoméricos más abundantes, presente en concentraciones de 65-165 mg L⁻¹ en vinos tintos y en vinos blancos varía entre 4-11 g L⁻¹ (Ojeda, 2007). Este ácido posee una importante actividad antioxidante (Kim et al., 2002), antimutagénica (Gichner et al., 1987) y cardioprotectora (Priscilla et al., 2009). Dentro de los principales exponentes del grupo de los **estilbenos** tenemos fitoalexinas y resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno), siendo este último un antioxidante potente a pesar de encontrarse en baja concentración en vinos. Los **taninos hidrolizables** provienen de vinos añejados en roble y se distinguen dos categorías: Los galotaninos, que poseen ácido gálico y elagitaninos que contienen ácido elágico. Bajo condiciones ácidas, los taninos hidrolizables que provienen de no flavonoides rompen sus enlaces debido a que el pH bajo debilita el enlace entre átomos de hidrógeno y oxígeno (Jackson, 2008).

1.2.2 Metales de transición

Los metales presentes en el vino, pueden provenir de fuentes endógenas y exógenas, como se representa en la Figura 3.

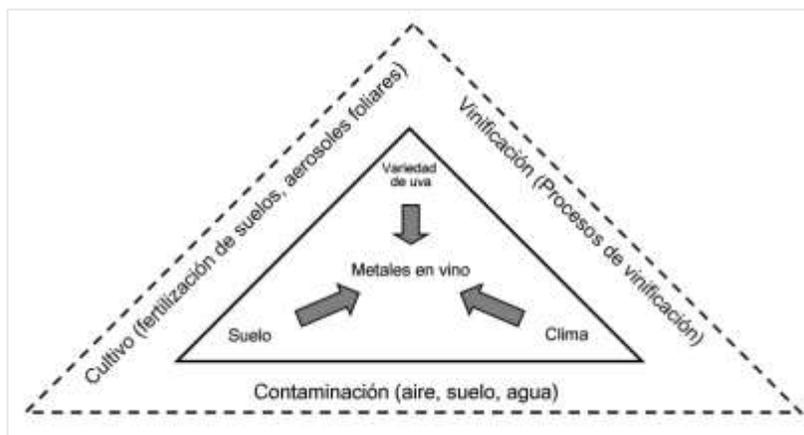


Figura 3. Fuentes de metales en vino: endógenas (línea sólida) y exógenas (línea punteada). (Pohl, 2007)

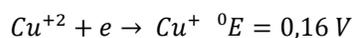
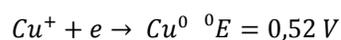
Las fuentes endógenas se asocian a la madurez de las uvas, la variedad, el tipo de suelo del viñedo y las condiciones climáticas durante el crecimiento (Gonzalez et al., 1996). Como fuentes exógenas está la contaminación externa en las diferentes etapas de vinificación, desde la cosecha hasta el embotellado y almacenamiento. La contaminación durante el crecimiento de la uva en el viñedo debida al empleo de pesticidas, fungicidas y fertilizantes que contienen cadmio, cobre, manganeso, plomo y zinc durante la temporada de crecimiento de esta, llevan a un aumento de estos metales en el vino (Galani-Nikolakaki et al., 2002). Vinos provenientes de viñedos ubicados cerca de caminos o áreas industriales contienen altos niveles de cadmio plomo, este último debido a emisiones vehiculares al aire, agua y suelo (Cvetkovic et al., 2006). Finalmente, existe una fuente enológica de metales, ya que la contaminación puede ocurrir en distintas etapas del proceso de vinificación. Esto se debe al extenso tiempo de contacto del vino con materiales como aluminio, latón, vidrio, acero inoxidable y madera, que forman parte de maquinaria, tuberías y barriles empleados en el manejo y almacenamiento del vino. Sin embargo, lo descrito anteriormente es cada vez menos común.

Los metales afectan las propiedades organolépticas características del vino, como sabor, frescura, “*flavor*”, principalmente debido a la formación de precipitados o enturbiamiento durante la fermentación del vino, maduración y almacenamiento (Galani-Nikolakaki et al., 2002).

En vinos blancos, cobre, hierro y manganeso son responsables de cambios en la estabilidad de vinos añejos y de la modificación de la calidad sensorial de vinos luego de su embotellado. Este fenómeno es llamado *browning* e involucra una serie de reacciones de oxidación de componentes orgánicos del vino (flavonoides y no flavonoides), llevando a una pérdida de aroma y color, junto a la aparición de taninos condensados (Benítez et al., 2002). También, forman complejos estables con aminoácidos, compuestos polifenólicos y metaloides. Estos se forman durante la maduración del vino y su almacenamiento, determinan las características de envejecimiento, aroma final, sabor y color del vino. Además, la asociación de cationes de cobre, hierro y manganeso con ligandos quelantes orgánicos conforma un mecanismo antioxidante que disminuye la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) responsables de reacciones de deterioro del vino (Waterhouse, 2006).

1.2.2.1 Cobre

El cobre es un micronutriente esencial para la mayoría de los organismos, ya que es constituyente de muchas metalo-enzimas y de otras proteínas implicadas en los procesos de transporte de electrones y en reacciones de óxido reducción (Hernández-Colorado et al., 2012).



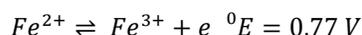
Una de las fuentes del cobre presente en el vino deriva del empleo de fungicidas contra el mildiu (*Plasmopara vitícola*), que es un hongo que ataca todos los órganos verdes de la viña y que se propaga en ciertas condiciones. Para su control se utilizan

principalmente productos a base de cobre, como el caldo bordelés (sulfato de cobre) y el oxiclورو (García-Mudarra, 2008).

En vinos aireados, el cobre se encuentra en su estado oxidado Cu (II). Sin embargo, en vinos embotellados se generan condiciones reductoras debido a la ausencia de oxígeno y a la presencia de dióxido de azufre y ácido ascórbico, contribuyendo a la precipitación y depósitos de cobre en vino a una concentración más alta que la crítica (AWRI, Australian Wine Research Institute). Además, aún a concentraciones bajas, el cobre actúa como catalizador de oxidación y está involucrado en las transformaciones oxidativas que ocurren en vinos tintos durante el envejecimiento.

1.2.2.2 Hierro.

El hierro es un metal extendido en la corteza de la Tierra, representando casi un 5% de su masa total. En vinos se encuentra en la forma de iones ferroso (Fe^{+2}) y férrico (Fe^{+3}), manteniendo un balance de óxido-reducción de acuerdo al sistema redox activo siguiente:



El potencial de reducción de vinos, aún joven, es, a menudo, aproximadamente de 0,5 V. Este valor explica por qué el hierro está presente en su forma ferrosa y férrica. Gran parte del hierro está formando complejos, y, por lo tanto, es más difícil de identificar. La razón de las especies Fe^{+3}/Fe^{+2} en vino depende de las condiciones de almacenamiento, especialmente la concentración de dióxido de azufre libre.

En cuanto al potencial redox, es posible que el hierro en vino no esté totalmente en su forma iónica. Parte del hierro se encuentra formando complejos solubles con ácidos orgánicos, especialmente ácido cítrico (Ribéreau-Gayon, 2006). El hierro férrico es más probable a formar complejos que el hierro ferroso. Los iones ferroso y férrico, comprenden el hierro total, en ambas formas y en forma de complejos.

En vinos, se ha reportado concentraciones de hierro y cobre en los rangos de 0,11-3,6 mg L⁻¹ y 0,9-1,6 mg L⁻¹, respectivamente (Jackson, 2008).

1.3 Acidez y pH en vinos

El sabor ácido del vino es imprescindible, ya que, junto a los compuestos polifenólicos, contrarresta el sabor dulce proporcionado por los azúcares, alcoholes, etanol y la glicerina. Los ácidos que posee el vino provienen de la baya y otros son generados durante el proceso de fermentación. Las bayas aportan, principalmente, ácido tartárico, ácido málico y ácido cítrico. También, es posible encontrar ácido ascórbico, que es oxidable, y puede ser usado como adyuvante del dióxido de azufre. Durante la fermentación se generan ácidos como el ácido pirúvico y el ácido succínico (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Se distinguen diversas formas de acidez: acidez total, acidez volátil, acidez fija y la acidez real (Chatonnet, 2005).

La **acidez total** representa la acidez determinada por la neutralización química de las funciones ácidas de los ácidos minerales y orgánicos presentes en el medio. La participación de cada ácido en la acidez total está determinada por su constante de disociación K_a y su grado de salificación A^- , de acuerdo a la siguiente reacción:



La producción de iones H_3O^+ traduce el carácter ácido de la molécula AH. La disociación es una función de la constante K_a de acuerdo a lo siguiente:

$$K_a = \frac{[A^-] \cdot [H_3O^+]}{[AH]}$$

La **acidez volátil**, está compuesta por las formas libres y salificadas de los ácidos volátiles. Esta acidez monitoreada durante todo el proceso de vinificación, ya que un exceso de esta implica elevadas concentraciones de ácido acético, lo que afecta la calidad organoléptica del vino. La **acidez fija** es producto de la resta de la acidez volátil a la acidez total; es así como coincide con la fracción libre de los ácidos fijos y la fracción volátil y salificada de los ácidos volátiles. Al destilar el vino, estos no pasan al líquido destilado, quedan en el residuo. La **acidez real** del vino, expresada por el pH, equivale a la concentración de las funciones ácidas libres en él, es decir, corresponde a la concentración de iones H_3O^+ , responsables de la acidez. Esta

acidez se determina mediante un electrodo y un pH metro, se puede expresar en función de la concentración de iones H^+ , de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$pH = -\log_{10}[H_3O^+]$$

El pH del vino es el resultado del equilibrio de los diversos ácidos presentes en él, donde el más fuerte es el ácido tartárico. Con un pKa de 3,01 y una concentración en vinos desde 1,5 – 4,0 g L⁻¹ (Ribéreau-Gayon et al., 1998) es el primer ácido en salificarse y desplaza a los demás ácidos de sus sales. En estudios realizados en vino modelo se trabaja a concentraciones de ácido tartárico en un rango de 5 - 8 g L⁻¹ (Mirabel et al., 1999; Danilewicz, 2008; Nikolantonaki, 2010; Kreitman et al., 2013; Danilewicz, 2014).

El pH es uno de los factores más variables en el vino, comúnmente se encuentra en valores que van desde 3,2 a 3,9. A pH más altos, los compuestos polifenólicos pueden reaccionar directamente con el oxígeno, produciendo fenolatos. Sin embargo, esta reacción ocurre a valores de pH entre 7 y 9, valores alejados de lo encontrado normalmente en vinos (Waterhouse, 2006). En vinos se opta por valores relativamente bajos de pH porque: confiere un sabor de frescura a los vinos, mejora la estabilidad microbiana, reduce el *browning* y disminuye la necesidad de agregar dióxido de azufre. En vinos tintos, la intensidad de color y la tonalidad son mejores a valores bajos de pH (Jackson, 2008).

1.4 Oxidación del vino

En general, la oxidación de algunos constituyentes de los alimentos provoca un efecto perjudicial en la calidad de estos. Por ejemplo, la oxidación de lípidos insaturados provoca defectos en las propiedades sensoriales y una disminución del valor nutricional. El vino puede ser una excepción a esto ya que muchos vinos tintos se benefician de un cierto grado de oxidación al reducir su astringencia, estabilizar su color y liberar aromas. La velocidad de deterioro oxidativo no depende sólo de la cantidad de oxígeno disuelta, sino también de la composición del vino en particular,

incluyendo sus compuestos fenólicos, metales y dióxido de azufre presente (Laurie & Clark, 2010).

Los fenoles son los compuestos lábiles a oxidarse más importantes, debido a su facilidad para reaccionar con especies reactivas de oxígeno (ROS). Además de ser donadores de electrones a bajo pH, son conocidos por participar en reacciones de oxidación y son bastante diversos en cuanto a su estructura y propiedades redox (Laurie & Clark, 2010). En medio ácido, el equilibrio entre el fenol y fenolato estará inclinado hacia el fenol. La reacción directa entre estos compuestos (estado singlete) y el oxígeno (estado triplete) está prohibida por spín, por lo tanto, los metales de transición entran en juego catalizando estos procesos dada su habilidad de donar y aceptar electrones rápidamente (reciclaje redox) (Elias et al., 2010).

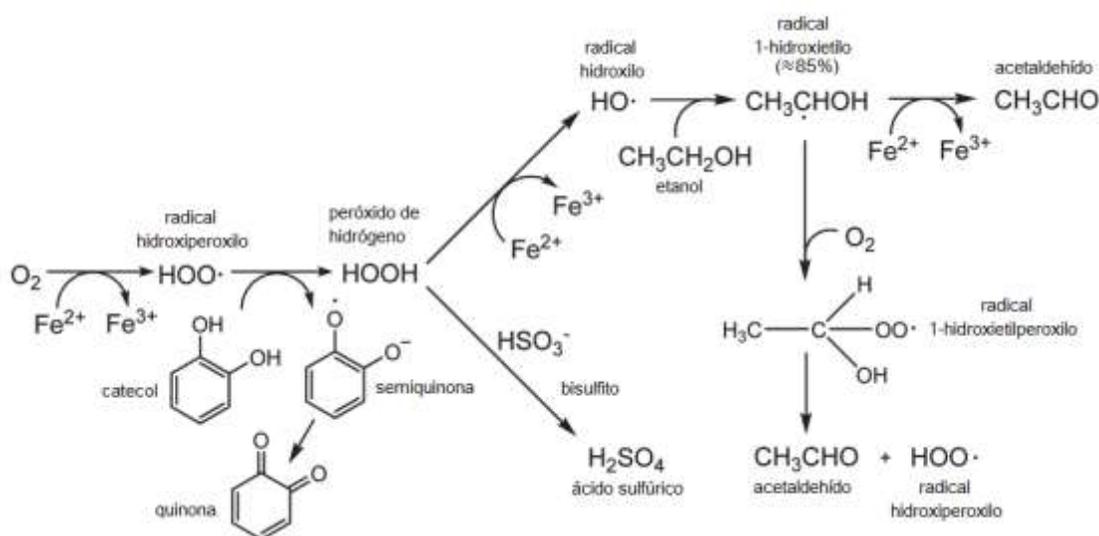


Figura 4. Mecanismo de oxidación no enzimática del vino vía reducción de oxígeno catalizada por metal y posterior oxidación de etanol (Propuesto por Elias et al., 2009)

De acuerdo al mecanismo de oxidación propuesto en la Figura 4, en presencia de hierro (II), el oxígeno se reduce para formar el radical superóxido, que, bajo condiciones ácidas del vino, es rápidamente convertido en radical hidroxiperoxilo ($\text{HOO}\cdot$), seguido de una reacción con compuestos fenólicos y una posterior reducción a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este puede reaccionar rápidamente con bisulfito (si está presente) (McArdle, 1983) o con metales de transición reducidos

(iones Fe (II) o Cu (I)), siendo la última una reacción más lenta. La reducción de peróxido de hidrógeno catalizada por metales, conocida como Reacción de Fenton, genera radicales hidroxilo (OH^\bullet) altamente oxidantes. Dada su alta reactividad, los radicales hidroxilo son capaces de reaccionar con los componentes del vino, y, como el etanol es la especie más abundante en él, este actúa como sustrato, generando mayoritariamente el radical 1-hidroxietil (1-HER). Este ha sido identificado por resonancia de spin electrónico (Elias et al., 2009) y, además, puede ser oxidado a acetaldehído, o también, reaccionar con otros componentes del vino.

Además de las especies radicalarias formadas durante la oxidación química del vino, los fenoles con grupos catecol o pirogalol son oxidadas a quinonas. Estos grupos pueden ser rápidamente oxidados por HOO^\bullet o por Fe (II) para formar radicales semiquinonas; la posterior quinona se forma luego de la pérdida de otro electrón por reacción con un radical o Fe (III).

Los productos de reacción descritos anteriormente pueden reaccionar posteriormente con otros componentes del vino, tales como antocianinas, dióxido de azufre, entre otros, dando como resultado muchos de los efectos organolépticos observados durante la oxidación del vino (Danilewicz, 2003; Waterhouse et al., 2006).

1.5 Capacidad antioxidante

El término “capacidad antioxidante” (CA) se utiliza para referirse a la capacidad que poseen los antioxidantes para atrapar radicales libres, aunque en otros casos se relaciona a la capacidad de inhibir la oxidación. Estos conceptos de capacidad antioxidante e inhibición de oxidación son distintos, por lo tanto la capacidad de los antioxidantes debe ser determinada mediante dos factores: la velocidad de *scavenging* y la cantidad de radicales libres atrapados (Galleano et al., 2010).

Un radical libre se define como cualquier especie (átomo, molécula o ión) capaz de existir de forma independiente que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital más externo. Esta es una característica común entre radicales. Muchos

radicales son inestables y altamente reactivos, siendo capaces de donar o aceptar un electrón desde otras moléculas, actuando como reductores u oxidantes (Cheeseman et al., 1993). En el organismo se producen varias especies reactivas a partir del metabolismo aeróbico en la mitocondria celular, dentro de ellas destacan: (i) Especies reactivas derivadas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*), tales como superóxido, hidroxilo, peroxilo y alcoxilo y (ii) Especies reactivas derivadas de nitrógeno (RNS, *reactive nitrogen species*), como óxido nítrico y dióxido nítrico.

Cuando el aumento del contenido de ROS sobrepasa las defensas antioxidantes se produce el estrés oxidativo, a través del cual se provoca daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El estrés oxidativo altera la funcionalidad celular, contribuyendo al desarrollo de enfermedades degenerativas como aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas y cáncer (Halliwell-Gutteridge et al., 1999).

Un antioxidante es una molécula lo suficientemente estable para donar un electrón o hidrógeno a un radical libre y estabilizarlo, reduciendo, así, su capacidad de reaccionar. Los antioxidantes retardan o inhiben el daño celular principalmente por su capacidad de *scavenging* (Halliwell, 1995). Además, un buen antioxidante debe tener persistencia en el tiempo y ser requerido en baja concentración. Estos antioxidantes pueden reaccionar con los radicales libres y poner término a la reacción en cadena antes de que las biomoléculas sufran daño.

Algunos de estos antioxidantes, como glutatión y ácido úrico son llamados antioxidantes endógenos, ya que se producen durante el metabolismo del cuerpo humano. Los antioxidantes exógenos se encuentran en la dieta (exógenos). Dentro de los principales antioxidantes en los alimentos es posible distinguir: (i) vitaminas, como vitamina E (α -tocoferol) y vitamina C (ácido ascórbico) (ii) carotenoides, entre los que destacan la luteína, licopeno, zeaxantina y astaxantina. (iii) compuestos polifenólicos, donde distinguen flavonoides y no flavonoides.

Los compuestos fenólicos se relacionan estrechamente con la capacidad antioxidante de un vino. No existe un único compuesto fenólico responsable de la actividad antioxidante del vino, sino que esta se explica por el conjunto de todos

ellos. Los principales compuestos asociados a la capacidad antioxidante son los derivados de ácidos benzoicos, ácidos cinámicos, estilbenos y flavonoides. Debido a su estructura química, estos compuestos pueden neutralizar radicales libres a través de la donación del átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo del anillo aromático (Pannala et al., 2001). Diversos estudios han demostrado que existe una alta correlación entre la composición fenólica y la capacidad antioxidante, obteniendo la mejor correlación con el método ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*) (Fernández-Pachón et al., 2004).

1.6 Mecanismos antioxidantes

Los antioxidantes pueden desactivar radicales libres principalmente por dos mecanismos: (i) transferencia de átomo de hidrogeno (HAT, *hydrogen atom transfer*) y (ii) transferencia electrónica (ET, *electron transfer*). El resultado final es el mismo, independiente del mecanismo, pero se diferencian en la cinética y en las posibles reacciones secundarias. Las reacciones de transferencia de electrones en conjunto con reacciones HAT pueden ocurrir en paralelo, y el mecanismo dominante en un sistema es determinado por la estructura y propiedades del antioxidante, solubilidad, coeficiente de partición y el solvente.

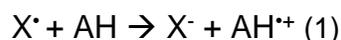
Los métodos basados en el mecanismo HAT miden la habilidad de un antioxidante de apagar radicales libres por una transferencia de hidrógeno, de acuerdo a la siguiente reacción:



Las mediciones de capacidad y reactividad antioxidante se basan en cinéticas de competencia. Las reacciones HAT dependen del solvente y del pH; son, generalmente, rápidas, llevándose a cabo desde segundos hasta minutos. La presencia de agentes reductores, afecta los ensayos basados en mecanismo HAT y pueden llevar a reactividades altas de manera errónea.

Los métodos basados en el mecanismo ET detectan la habilidad de un potencial antioxidante de transferir un electrón para reducir cualquier compuesto, incluyendo

metales, carbonilos y radicales de acuerdo a las siguientes reacciones (Wright et al., 2001):



Generalmente, ambos mecanismos ocurren simultáneamente en las muestras, con un balance determinado por la estructura del antioxidante y el pH. Este tipo de reacciones son comúnmente lentas y requieren largo tiempo para completarse. Por ello, los cálculos de capacidad antioxidante se basan en el porcentaje de disminución del producto en vez de la cinética. Cuando el $AH^{+\bullet}$ posee un tiempo de vida suficiente las reacciones secundarias a partir de él pueden ser interferentes en ensayos y pueden, incluso, llevar a toxicidad o alteraciones en el material genético celular *in vivo* (Sartor et al., 1999).

1.7 Métodos de determinación de capacidad antioxidante

Actualmente, se utilizan varios métodos para determinar la capacidad antioxidante en muestras tales como extractos de plantas, alimentos, antioxidantes comerciales, entre otros (Alam et al., 2012). Ningún método entrega la capacidad antioxidante de manera certera, ya que los antioxidantes pueden actuar por mecanismos muy diversos y en una misma muestra puede haber mezclas de estos con distintos mecanismos de acción. Los ensayos mas ampliamente utilizados están basados en los mecanismos antioxidantes explicados anteriormente (Sección 1.6). Dentro de los mecanismos HAT destacan ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) y TRAP (*Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*). Por otro lado, métodos como TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracilo) y FRAP (*Ferric Reducing-Antioxidant Power*) actúan por mecanismo ET (Prior et al., 2005).

El ensayo ORAC, de mecanismo HAT, mide la capacidad del antioxidante para atrapar los radicales peroxilo (OOH^{\bullet}) generados mediante la termólisis de 2,2'-azo-

bis-(2-amidino-propano)dihidrocloruro (AAPH) . Existe una competencia entre el antioxidante y la molécula sonda (Fluoresceína o Pirogalol rojo, según corresponda). Al ocurrir la reacción se registra el decaimiento de la fluorescencia o de la absorción, ya que la reacción del peroxilo con la sonda fluorescente forma un producto no fluorescente. Los resultados se reportan como equivalentes de Trolox, ya que es un compuesto símil hidrosoluble de la vitamina E. Se genera una curva de estándar usando el área bajo la curva ABC para cinco concentraciones de Trolox, y los equivalentes Trolox se calculan usando la relación lineal entre concentración de trolox y el área neta total bajo la curva de decaimiento. Se expresan como micromoles de equivalentes de Trolox por litro o por gramo de muestra ($\mu\text{mol de TE L}^{-1}$ o $\mu\text{mol de TE g}^{-1}$) (Ou et al, 2001).

Dentro de los métodos mencionados destaca el ensayo DPPH, donde actúa el radical 1,1-difenil-2-picrilhidracilo. Es uno de los pocos radicales orgánicos centrados en nitrógeno y exhibe un color violeta. Este ensayo está basado en la medición de la reducción de este radical debido a la acción de los antioxidantes, provocando una decoloración de violeta hacia amarillo, que es monitoreada por un espectrofotómetro a 517 nm (Prior et al., 2005). Este ensayo se basa principalmente en un mecanismo ET y una reacción secundaria puede ser la sustracción de un átomo de hidrógeno (Ou et al., 2005).

2 Planteamiento del problema

Dado que nuestro país es uno de los mayores productores de vino a nivel mundial, se han invertido considerables recursos en investigación científica enfocada principalmente en el proceso de vinificación ya que en este existen parámetros que afectan la composición química del vino y, por lo tanto, la calidad del producto final.

Por ello, al estudiar los efectos del pH y contenido de hierro en solución de vino modelo y en vino real, podríamos complementar el mecanismo de oxidación ya propuesto y dilucidar cómo se ve afectada la capacidad antioxidante y la calidad del producto terminado.

3 Hipótesis

Dado que la capacidad antioxidante del vino está asociada principalmente a los compuestos fenólicos, se plantea que la variabilidad en el contenido de hierro y el pH del medio, modificaría la capacidad antioxidante a través de la formación de complejos con determinados compuestos fenólicos presentes en el vino.

4 Objetivos

4.1 Objetivos generales

- ♦ Evaluar la variación de la capacidad antioxidante de tres tipos de soluciones de vino modelo, preparadas en base a diferentes compuestos polifenólicos, pH, y concentraciones de hierro.
- ♦ Evaluar el efecto del pH y hierro sobre la capacidad antioxidante en un vino tinto real.

4.2 Objetivos específicos

- ✦ Diseñar un análisis factorial “Screening 2³” para las variables: concentración de compuesto fenólico (ácido gálico (AG) o catequina (CAT) o ácido cafeico (CAT)), pH y concentración de hierro (III).
- ✦ Determinar la capacidad antioxidante de una solución de vino modelo con ácido gálico a diferentes pH y concentraciones de hierro por medio de ensayo DPPH[•], inicialmente y después de 20 días.
- ✦ Determinar la capacidad antioxidante de una solución de vino modelo con catequina a diferentes pH y concentraciones de Hierro por medio de ensayo DPPH[•], inicialmente y después de 20 días.
- ✦ Determinar la capacidad antioxidante de una solución de vino modelo con ácido cafeico a diferentes pH y concentraciones de Hierro por medio de ensayo DPPH[•], inicialmente y después de 20 días.
- ✦ Determinar la capacidad antioxidante de un vino a diferentes pH y concentraciones de Hierro por medio de ensayo DPPH[•] y ORAC-FL, inicialmente y después de 7 y 21 días.

5 Materiales y métodos

5.1 Materiales

5.1.1 Muestras de vino

Se trabajó con un vino Cabernet Sauvignon 2016 de la viña Morandé, dividido en dos grupos de muestras: El primer grupo recibió un tratamiento con resina de intercambio iónico “Ion Exchanger I” (Tabla I, ANEXO) (Codificado: Vino CR), mientras que el segundo no recibió dicho tratamiento (Codificado: Vino SR). Cada grupo de vinos correspondió a tres botellas de 375 mL cada una con tapa rosca, a modo de realizar evaluaciones en triplicado. El contenido de metales y diversas propiedades del vino se encuentran en las Tabla 1 y Tabla 2. El procedimiento de uso de la resina de intercambio catiónico se encuentra detallado en Tabla II de ANEXO.

Tabla 1. Contenido de metales de los vinos*.

Concentración Metal (mg L ⁻¹)	Potasio K	Sodio Na	Calcio Ca	Magnesio Mg	Cobre Cu	Manganeso Mn	Hierro Fe	Zinc Zn
Vino CR	4,5	1,5	3,8	1,2	0,0011	0,2	0,0012	0,08
Vino SR	954,5	14,7	53,4	90,4	0,052	1,0	1,0	0,47

(*) Datos entregados por la Universidad de Talca (IPC-OES).

Tabla 2. Propiedades de los vinos estudiados*.

Tipo de vino	A (420 nm)	pH	Conductividad eléctrica (Ohm)	SO ₂ libre (ppm)
Vino CR	0,460	3,48	2,63	6,1
Vino SR	0,479	2,03	4,02	2,9

(*) Datos entregados por la Universidad de Talca (IPC-OES).

5.2 Reactivos

DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), Sigma Aldrich. Ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico), Sigma-Aldrich. Catequina, Sigma Aldrich. Ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinámico), Sigma-Aldrich. Ácido tartárico (L-(+)-ácido tartárico), Sigma-Aldrich. Cloruro de Hierro (III), Sigma Aldrich. Hierro (II) amonio sulfato sextahidratado, Winkler. Agua grado HPLC, Merck. Etanol grado analítico, Merck. Hidróxido de Sodio 1M, Sigma-Aldrich. Ácido Clorhídrico 1M, Sigma-Aldrich. Agua destilada (producción propia). Fluoresceína (3',6'-dihidroxiespiro[2-benzofuran-3,9'-xanten]-1-ona), Fluka Analytical. AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamida)), Sigma-Aldrich. Buffer fosfato pH 7,4 (fosfato monopotásico, fosfato disódico). Carbonato de sodio, Riedel de Haenag Seelze-Hannover. Reactivo de Folin Ciocalteu, Merck. Ion Exchanger I (Merck, código 104765).

5.3 Métodos

5.3.1 Métodos para análisis en vino modelo

5.3.1.1 Preparación de vino modelo

El vino modelo consistió en una solución acuosa (agua grado HPLC) de etanol al 12% v/v y 6 g L⁻¹ de (+)-ácido tartárico (0,04 M) (Danilewicz, 2007; Nikolantonaki, 2010; Kreitman, 2013; Danilewicz, 2014) preparada en un matraz de aforo con agitación a temperatura ambiente durante 20 minutos. Para preparar cada serie o experimento de las Tablas 4, 5 y 6 (**Sección 5.3.1.2**), se tomó un volumen de 20 mL de vino modelo y se ajustó el pH con NaOH 1 M utilizando un pHmetro Microprocessor pH/ion Meter pMX. Luego, de acuerdo al diseño experimental, se fueron añadiendo cantidades del compuesto polifenólico correspondiente (Figura I. ANEXOS) y hierro, completando el total de 11 experimentos (codificados desde A hasta K). Las muestras fueron medidas en triplicado el mismo día de su preparación, fueron almacenadas en oscuridad a -4°C y luego de veinte días se analizaron nuevamente para ver si habían cambios de CA en el tiempo.

5.3.1.2 Diseño experimental basado en Screening factorial 2³

Para estudiar el efecto de las variables químicas sobre la capacidad antioxidante se realizó un diseño experimental de “screening” factorial. Estos métodos estadísticos se utilizan para evaluar los resultados obtenidos en el análisis químico y son igualmente adecuados en las etapas previas de planificación y diseño de experimentos. Con el software Statgraphics Plus se realizó el diseño experimental screening factorial 2³ con tres centros. Los valores máximos y mínimos se presentan en la Tabla 3, y fueron determinados de acuerdo a bibliografía. [Ácido gálico: (Burns et al., 2000), (Rodriguez et al., 2002), (Killinc et al., 2003), (Gambelli et al., 2004)]; [Catequina: (Pascual et al., 2000), (Minussi et al., 2003), (Rossouw et al., 2004)]; [Ácido cafeico: (Minussi et al., 2003), (Robbins et al., 2004), (Jandera et al., 2005)].

Para el análisis estadístico, las variables fueron codificadas con valores -1, 0 y 1, donde a las concentraciones menores les correspondía el -1, a las medias el valor 0 y a las mayores concentraciones el valor 1.

Tabla 3. Factores experimentales y sus respectivos valores máximos y mínimos.

Factor	Valor Mínimo	Valor Máximo
pH	3,0	4,0
Concentración de Compuesto fenólico	Ácido Gálico (AG) 7,7 mg L ⁻¹ 45 µM	Ácido Gálico (AG) 31,8 mg L ⁻¹ 186 µM
	Catequina (CAT) 9 mg L ⁻¹ 31 µM	Catequina (CAT) 50 mg L ⁻¹ 172 µM
	Ácido Cafeico (CAF) 2 mg L ⁻¹ 11 µM	Ácido Cafeico (CAF) 10 mg L ⁻¹ 56 µM
Concentración de Fe³⁺ (FeCl₃)	0,1 mg L ⁻¹ 0,616 µM	5,0 mg L ⁻¹ 30 µM

Las estructuras de cada compuesto polifenólico se encuentran en Figura I de la sección de ANEXOS. En las Tablas 4, 5 y 6 se presentan todas las posibles combinaciones entre los valores máximos y mínimos para las tres variables, distribuidas al azar, manteniendo un punto central repetido tres veces, para comprobar la reproducibilidad del método.

Las mediciones de capacidad antioxidante se realizaron en triplicado y, a partir de los resultados, se pudo analizar qué factor tendría mayor significancia estadística para los ensayos de capacidad antioxidante por medio de ensayo de DPPH.

Tabla 4. Modelo experimental para vino modelo con ácido gálico como compuesto fenólico.

Experimento	pH	AG (μM)	Fe (III) (μM)	DPPH (% inhibición)
A	3,0	45	30	
C	3,0	45	0,616	
D	3,0	186	0,616	
I	3,0	186	30	
B	3,5	115	15	
E	3,5	115	15	
H	3,5	115	15	
J	4,0	45	30	
K	4,0	45	0,616	
F	4,0	186	0,616	
G	4,0	186	30	

Tabla 5. Modelo experimental para vino modelo con catequina como compuesto fenólico.

Experimento	pH	CAT (μM)	Fe (III) (μM)	DPPH (% inhibición)
A	3,0	31	30	
C	3,0	31	0,616	
D	3,0	172	0,616	
I	3,0	172	30	
B	3,5	101	15	
E	3,5	101	15	
H	3,5	101	15	
J	4,0	31	30	
K	4,0	31	0,616	
F	4,0	172	0,616	
G	4,0	172	30	

Tabla 6. Modelo experimental para vino modelo con ácido cafeico como compuesto fenólico.

Experimento	pH	CAF (μM)	Fe (III) (μM)	DPPH (% inhibición)
A	3,0	11	30	
C	3,0	11	0,616	
D	3,0	56	0,616	
I	3,0	56	30	
B	3,5	33	15	
E	3,5	33	15	
H	3,5	33	15	
J	4,0	11	30	
K	4,0	11	0,616	
F	4,0	56	0,616	
G	4,0	56	30	

5.3.1.3 Capacidad antioxidante

5.3.1.3.1 Determinación de la capacidad antioxidante por medio de ensayo DPPH (Porcentaje de inhibición del radical).

Este estudio se basó en la medida fotométrica de la reducción del radical DPPH[•] (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) a una longitud de onda aproximada de 517 nm, realizada en un Espectrómetro UV-Vis Specord 600.

Para esta determinación se agregó 20 µL de vino modelo a un tubo de ensayo con 3 mL de una solución de DPPH[•] 0,09 M aprox., equivalente a una unidad de absorbancia. Luego de la adición, se incubó en oscuridad durante 15 minutos y se registró la absorbancia de cada solución, permitiendo la obtención del porcentaje de inhibición de DPPH[•] de acuerdo a lo siguiente:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{A_0 - A_M}{A_0} \cdot 100 \%$$

Donde:

A₀: Absorbancia del blanco.

A_M: Absorbancia de la muestra

5.3.2 Métodos para análisis en vinos reales

5.3.2.1 Determinación de polifenoles totales por medio de ensayo Folin-Ciocalteu

5.3.2.1.1 Curva de Calibración de ácido gálico

Para realizar la curva de calibración se utilizó ácido gálico como estándar, ya que es una sustancia relativamente estable, fácil de conseguir y representativa de los vinos. En cuanto a su estabilidad, se ha estudiado que en soluciones estándar, estas pierden menos 5% de su concentración al ser almacenadas y refrigeradas por dos semanas (Waterhouse, 2001).

Se preparó una solución de carbonato de sodio al 20% m/v en matraz de aforo. Para el reactivo de Folin-Ciocalteu (2N), se tomó 1500 μL de este y se agregó a un vaso precipitado con 13,5 mL de agua destilada. La solución estándar de ácido gálico se preparó a una concentración de 280 mg L^{-1} en agua destilada. El volumen de la placa se completó de acuerdo a lo indicado en la Tabla 7.

Tabla 7. Diluciones para la curva de calibración de ácido gálico.

Volumen estándar ácido gálico (μL)	Volumen de agua (μL)	Concentración de ácido gálico (mg L^{-1})
70	930	19,6
280	720	79,8
430	570	120,4
710	290	200,2
860	140	240,8
1000	0	280

Por lo tanto, se obtiene una curva de calibración mg L^{-1} de ácido gálico versus unidades de absorbancia.

5.3.2.1.2 Ensayo de evaluación del contenido de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

Este análisis consistió en la medida espectrofotométrica a 765 nm de la aparición del color azul/violeta proveniente de la reducción del reactivo de Folin (amarillo) provocada por los antioxidantes presentes en el vino.

La absorbancia fue medida en un multilector de multiplaca Synergy de BioTek Instruments Inc, utilizando microplacas de poliestireno transparentes de 96 celdas con un tiempo de incubación de 30 minutos a 37°C.

El volumen final de cada celda de la microplaca fue de 300 μL y el medio de reacción estaba compuesto de carbonato de sodio 20 % m/v y agua nanopura. Utilizando una micropipeta multicanal se agregó 200 μL de reactivo de Folin, 40 μL de carbonato de sodio, 45 μL de agua nanopura y 15 μL de vino previamente diluido en etanol:agua a razón de 1:10. El blanco contenía etanol: agua. El resultado final

se obtuvo interpolando en la curva de calibración de ácido gálico y se expresó en mg de ácido gálico equivalentes por litro de vino (mg EAG L⁻¹ vino).

5.3.2.2 Ajustes de pH y concentración de Hierro en vinos.

5.3.2.2.1 Determinación de pH inicial y posterior ajuste de este en vinos reales.

Como se mencionó en la sección 5.1.1, se trabajó con un vino Cabernet Sauvignon, dividido en dos grupos: uno de ellos fue sometido a tratamiento de resina de intercambio iónico (codificado: Vino CR) y el otro sin tratamiento (codificado: Vino SR). Esto con el objetivo de analizar el mismo vino a diferente pH y contenido de metales.

El pH de los vinos reales se midió en triplicado mediante el uso de un pH metro Microprocessor pH/ion Meter pMX. Antes de cada medición, el pHmetro se calibró con soluciones tampón 4,0 y 7,0.

Para los análisis de capacidad antioxidante, se tomó una alícuota de 20 mL de cada vino y se realizó un ajuste de pH a los valores de 3,0; 3,4 y 4,0 utilizando para ello NaOH 1M o HCl 1M, según correspondiera. Cada vino con el pH ya modificado se mantuvo en oscuridad y a temperatura ambiente durante dos horas antes del análisis de capacidad antioxidante. Luego del análisis de capacidad antioxidante del día inicial, las muestras de vino se almacenaron en oscuridad a -4°C y fueron analizadas luego de siete y veintiún días para evaluar el efecto del tiempo en ellas.

5.3.2.2.2 Ajuste de concentración de hierro en vinos reales.

Como se mencionó anteriormente el grupo de vinos que recibieron el tratamiento de resinas de intercambio iónico (Vinos CR) tuvo menor concentración de hierro en comparación a los vinos sin el tratamiento (Vinos SR). Las concentraciones de hierro y otros metales se encuentran detalladas en la Tabla 1 (Sección 5.1.1). De acuerdo a esta información, se midió la capacidad antioxidante inicial de vinos CR y SR; y

posteriormente, se aumentó la concentración de hierro con una solución de FeCl_3 en ambos vinos a 5 mg L^{-1} y se analizó la capacidad antioxidante nuevamente. Igual al caso anterior, estas muestras de vino se almacenaron en oscuridad a -4°C y fueron medidas luego de siete y veintiún días.

5.3.2.3 Capacidad antioxidante

5.3.2.3.1 Determinación de la capacidad antioxidante por medio del ensayo DPPH (Porcentaje de inhibición del radical)

Se empleó la misma metodología de la sección **5.3.1.3.1**, con la diferencia de que la muestra de vino real a analizar se diluyó en etanol/agua a razón 1:10.

5.3.2.3.2 Determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo ORAC-FL.

Este método mide la degradación oxidativa de la molécula sonda fluoresceína (3,6-dihidroespiro[isobenzofuran-1-(3H),9(9H)-xanten]3-ona) después de interactuar con el radical peroxilo (ROO^\bullet) generado térmicamente a partir de AAPH (2,2'-Azo-bis(2-metilpropionamida) dihidrocloruro (Ou et al., 2001).

La fluorescencia se midió cada 1 minuto durante un tiempo determinado con una excitación a una longitud de onda de 485 nm y una emisión de 528 nm en un multilector de microplacas Synergy HT, de Bio-Tek Instruments Inc., utilizando microplacas de poliestireno blancas de 96 celdas. Se utilizó el programa Gen 5 para controlar el multilector.

El volumen final en cada celda de la microplaca fue de 200 μL y el medio de reacción fue buffer fosfato 75 mM a pH 7,4. Empleando una micropipeta multicanal se agregó en cada celda 150 μL de fluoresceína cuya concentración final fue 54,5 mM, además de 25 μL de cada solución de vino preparada de acuerdo a la Tabla 8.

Tabla 8. Soluciones de vino para ORAC-FL.

Alícuota de vino (µL)	Volumen de EtOH/H ₂ O (µL)	Concentración final (µL de vino por mL de solución)
0	300	-
30	270	0,13
45	255	0,20
60	240	0,26
75	225	0,33
100	200	0,43

De esta forma se obtuvo seis diferentes concentraciones, incluida una solución blanco representada por etanol:agua 1:10. La microplaca fue preincubada por 15 minutos a 40°C en el multilector y posteriormente se agregó 25 µL de AAPH, cuya concentración final en cada celda fue 18,75 mM.

Este método se aplicó a las muestras de vino real y también a los experimentos en vino modelo. En el caso de estas últimas, no fue posible observar variación en los resultados derivados de la acidez real, ya que este análisis se realiza a pH 7,4 controlado con buffer.

5.3.3 Análisis Estadístico

Los resultados fueron presentados como el promedio de tres determinaciones más su desviación estándar. La significancia estadística de los resultados obtenidos al evaluar la capacidad antioxidante de los experimentos en vino modelo y muestras de vino real fue determinada por análisis de varianza de una vía (ANOVA), considerándose estadísticamente significativos para $p \leq 0,05$.

6 Resultados y discusión

6.1 Vino modelo

6.1.1 Capacidad antioxidante de vinos modelo por medio de ensayo DPPH

6.1.1.1 Vino modelo con ácido gálico (AG)

De acuerdo al análisis multivariable (Tabla 4) planteado en la sección 5.3.1.2, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9. El resultado del análisis estadístico se presenta en la Figura 5.

Tabla 9. Capacidad antioxidante inicial de vino modelo con ácido gálico como compuesto polifenólico.

Experimento	pH	A G (μM)	Fe (III) (μM)	% inhibición DPPH (t=día 0)
A	3,0	45	30	3,6 ± 0,4
C	3,0	45	0,616	2,4 ± 0,5
D	3,0	186	0,616	10,6 ± 0,6
I	3,0	186	30	9,05 ± 0,18
B	3,5	115	15	4,6 ± 1,2
E	3,5	115	15	4,9 ± 0,1
H	3,5	115	15	4,8 ± 0,3
J	4,0	45	30	3,4 ± 0,5
K	4,0	45	0,616	2,1 ± 0,1
F	4,0	186	0,616	10,8 ± 0,4
G	4,0	186	30	11,1 ± 0,4

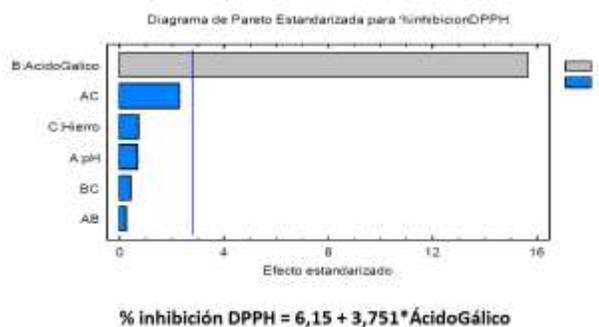


Figura 5. Carta de Pareto para ácido gálico a tiempo cero. (Donde: A, pH; B, concentración de ácido gálico; C: concentración de hierro (III); AB, BC, AC interacciones). Además, se presenta la ecuación simplificada del modelo.

Análisis univariable

Al analizar los experimentos realizados de forma univariable, a tiempo cero se observa que los experimentos con mayor concentración de ácido gálico (AG) (186 μM), experimentos G ($11,1 \pm 0,4 \%$), F ($10,8 \pm 0,4 \%$), D ($10,6 \pm 0,58 \%$) e I ($9,05 \pm 0,18 \%$), presentaron la mayor capacidad antioxidante. De este grupo, se observa que el de menor valor es el I ($9,05 \pm 0,18$), siendo diferente estadísticamente a los otros ($p < 0,05$), teniendo pH en su nivel mínimo (pH 3,0) y la máxima concentración de hierro (30 μM).

Los experimentos con menor concentración de ácido gálico (45 μM), experimentos A ($3,6 \pm 0,4 \%$), C ($2,5 \pm 0,5 \%$), J ($3,4 \pm 0,5 \%$) y K ($2,1 \pm 0,1 \%$) presentaron los valores más bajos en capacidad antioxidante y no presentaron diferencias significativas entre ellos. De este grupo, los que poseen valores más pequeños son C y K, ambos contienen hierro en su menor concentración (0,616 μM).

Los puntos centrales presentaron un promedio de 4,76% de capacidad antioxidante, que es un valor de capacidad antioxidante medio entre los valores con mayor concentración de AG y con menor concentración de AG.

Por lo tanto, en una primera aproximación, analizando los datos de forma univariable, se puede mencionar que la capacidad antioxidante de las soluciones modelo utilizadas en este experimento, depende, principalmente, de la concentración del ácido gálico. Por otro lado, no se observó un efecto claro de la concentración de hierro, ni la variación del pH.

Análisis multivariable

De acuerdo al análisis estadístico se obtuvo un diagrama de Pareto (Figura 5) que indica al ácido gálico como única variable estadísticamente significativa, con una contribución positiva. Este resultado es concordante con el análisis univariable descrito anteriormente. No resultaron significativas las variables; pH, la concentración de hierro y la interacción de estas variables. La ecuación obtenida de este análisis, implica que la capacidad antioxidante incrementa en 3,751 unidades

cuando la concentración de ácido gálico incrementa desde 45 μM (valor mínimo) a 186 μM (valor máximo).

Por lo tanto, de este experimento se puede afirmar que la concentración de ácido gálico es la determinante de la variación de la capacidad antioxidante (CA) de forma directamente proporcional, sin tener efecto el pH y la concentración de hierro, cuando los experimentos son realizados en vino modelo a estas concentraciones.

6.1.1.2 Vino modelo con Catequina (CAT)

De acuerdo al análisis multivariable (Tabla 5) planteado en la sección 5.3.1.2, los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 10. El resultado del análisis estadístico se presenta en la Figura 6.

Tabla 10. Capacidad antioxidante inicial de vino modelo con catequina como compuesto polifenólico.

Experimento	pH	C A T (μM)	Hierro (III) (μM)	% inhibición DPPH (t=0)
A	3,0	31	30	1,09 \pm 0,13
C	3,0	31	0,616	0,8 \pm 0,6
D	3,0	172	0,616	3,8 \pm 0,2
I	3,0	172	30	2,2 \pm 0,03
B	3,5	101	15	2,3 \pm 0,3
E	3,5	101	15	2,3 \pm 0,4
H	3,5	101	15	2,7 \pm 0,1
J	4,0	31	30	0,8 \pm 0,02
K	4,0	31	0,616	0,7 \pm 0,5
F	4,0	172	0,616	3,0 \pm 0,4
G	4,0	172	30	4,2 \pm 0,4

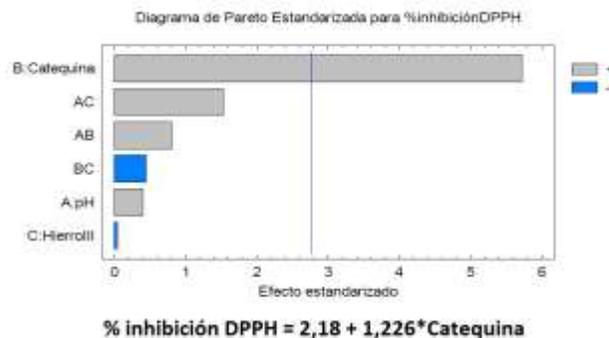


Figura 6. Carta de Pareto para catequina a tiempo cero. (Donde: A, pH; B, concentración de catequina; C: concentración de hierro (III); AB, BC, AC interacciones). Además, se presenta la ecuación simplificada del modelo.

Análisis Univariable

Al realizar un análisis univariable se observa un comportamiento similar al de ácido gálico. Los experimentos con concentración máxima de catequina presentaron la mayor capacidad antioxidante, G ($4,2 \pm 0,4$ %), D ($3,8 \pm 0,2$ %), F ($3,0 \pm 0,4$ %) e I ($2,2 \pm 0,03$ %), este último presenta el valor más bajo del grupo ($p < 0,05$) el cual posee pH en su valor mínimo (3,0) y hierro en su concentración máxima (30 μM). Comportamiento similar a lo que ocurre con ácido gálico, en el grupo que presentó mayor capacidad antioxidante.

Los experimentos con menor concentración de catequina presentaron, también, los menores valores en capacidad antioxidante, experimentos A ($1,09 \pm 0,13$ %), J ($0,8 \pm 0,02$ %), C ($0,8 \pm 0,6$ %) y K ($0,7 \pm 0,5$ %). En este grupo no se pueden hacer diferencias entre los valores, ya que la desviación estándar de estos es alta, y por lo tanto no son estadísticamente diferentes.

Los puntos centrales presentaron un valor promedio de 2,4 % en su capacidad antioxidante, siendo, también, un valor medio entre los valores de capacidad antioxidante mayores y menores.

Análisis Multivariable

De acuerdo a la Figura 6 se observa que la variable estadísticamente significativa es la concentración de catequina, también con una contribución positiva. Las demás variables; pH, concentración de hierro y la combinación de ellas no resultaron

significativas. Estos resultados son similares a los de ácido gálico. La ecuación presentada indica que la capacidad antioxidante incrementa en 1,226 unidades cuando la concentración de catequina aumenta desde 31 μM (valor mínimo) a 172 μM (valor máximo).

El análisis multivariable coincide con el univariable, donde a mayor concentración de catequina es mayor la capacidad antioxidante, sin tener influencia el pH y la concentración de hierro, cuando los experimentos son realizados en vino modelo a estas concentraciones.

Por otro lado, se puede observar en las ecuaciones obtenidas para ambos compuestos, el incremento de la CA del ácido gálico (3,751) es mayor que para la catequina (1,226), a pesar que el incremento en concentración es igual (141 μM). Se debe destacar que estos incrementos son válidos en las condiciones de vino modelo y para el ensayo de capacidad antioxidante DPPH.

En este estudio, ácido gálico (AG) y catequina (CAT) presentaron resultados similares, concluyendo que ni el pH ni la concentración de hierro (III) influyen en la capacidad antioxidante en vino modelo. Al realizar estos experimentos se consideró posible la formación de complejos de estos compuestos fenólicos con el hierro (III), debido a información encontrada en literatura.

Moran (Moran et al., 1996) reportó la formación de complejos de ácidos fenólicos, ácidos cinámicos y flavonoides presentes en nódulos de soya con hierro (III), en ese estudio se concluyó que sólo los compuestos que poseían grupos catecol y pirogalol en su estructura (ANEXO, Figura II) eran quelantes potentes de hierro (III) a pH 5,5. AG y CAT poseen estos grupos funcionales: el grupo pirogalol está presente en el ácido gálico y la catequina posee catecol en su estructura. Por ello, considerando sólo la estructura de las moléculas utilizadas en los experimentos de vino modelo anteriormente presentados, sería posible la formación de complejos de hierro (III). Sin embargo, el rango de pH en que se trabajó ($3,0 < \text{pH} < 4,0$), podría hacer menos probable la complejación.

Respecto al ácido gálico (AG), Fazary y colaboradores reportaron la formación de un complejo 1:1 de ácido gálico con hierro (III) a pH 2,5 en medio etanólico. Este complejo se formaba por la unión de hierro (III) en el catecol del ácido y, posteriormente, a pH 5,5, se formaba un complejo 1:2, donde dos moléculas de ácido gálico quelaban al hierro (III) (Fazary et al., 2009). Este estudio nos presenta la posibilidad de la formación del complejo 1:1 en vino modelo a pH 3,0, que es cercano a 2,5, pero aun así podría no ser probable ya que ese estudio fue realizado en medio etanólico y el vino modelo es una solución hidroalcohólica (12% de etanol/H₂O).

En el caso de la catequina (CAT), se ha estudiado, en medio acuoso, la formación de complejos de hierro (III) con catequina y con ácido nitriloacético, a modo de comparación. Este último es un quelante orgánico de hierro muy estudiado, que forma un complejo debido a un enlace hierro(III)-nitrógeno y a dos enlaces hierro(III)-OH carboxílicos. En ese estudio, se encontró que al mezclar soluciones de catequina ($4 \cdot 10^{-4}$ M) y hierro (III) ($1 \cdot 10^{-4}$ M), a pH < 4,0, se formaba el complejo catequina-hierro(III) (Elhabiri et al., 2007). De acuerdo a lo anterior, en el estudio de vino modelo con catequina podría existir el complejo catequina-hierro(III) a pH 4,0; pero el vino modelo utilizado en esta tesis, contenía 12% de etanol y el estudio mencionado se realizó en medio acuoso. Por otra parte, las cantidades utilizadas en ese estudio para la formación del complejo son muy superiores a las presentes en el vino modelo estudiado: $3,1 \cdot 10^{-5}$ M < catequina < $1,72 \cdot 10^{-4}$ M y $6,1 \cdot 10^{-7}$ M < Hierro (III) < $3 \cdot 10^{-5}$ M y, también, superiores a las reportadas en vinos tintos. Esto último podría explicar los resultados obtenidos para la catequina, donde no se observó efecto, ni de la concentración de hierro, ni variación del pH.

Sin embargo, estudios realizados en vino modelo indican que la formación de los complejos de ácido gálico y catequina con hierro (III) se vería impedida por la presencia de ácido tartárico. El hierro (III) coordina fuertemente con ácido tartárico (L) formando un complejo dimérico del tipo $[\text{Fe}_2(\text{L}^{2-})_2(-3\text{H}^+)]^-$ sobre pH 2,0, siendo esta especie la predominante a pH 3,5 (Timberlake, 1964). Además, Danilewicz, 2014 ha reportado que, en vino modelo (5 g de ácido tartárico y 20 mg L⁻¹ de hierro

(III)), el catecol del compuesto 4 metil-catecol es un ligando demasiado débil para competir contra el ácido tartárico por el hierro (III) (Danilewicz, 2014). Basándonos en estos estudios podríamos decir que en los experimentos de vino modelo con AG y CAT no existiría formación de complejos con hierro debido a la presencia de ácido tartárico y eso explicaría que la única variable que afecta la capacidad antioxidante es la concentración del compuesto polifenólico.

Por otra parte, es probable que los polifenoles logren competir eficazmente contra el ácido tartárico por el hierro (III) en vinos tintos con altas concentraciones de compuestos polifenólicos y concentraciones inferiores de ácidos, tales como tartárico, malico, acético, etc. (Danilewicz, 2014). Sin embargo, se ha postulado que debido al pH ácido en el vino los complejos de metales con compuestos polifenólicos son poco estables (Kreitman et al., 2013).

6.1.1.3 Vino modelo con ácido cafeico (CAF)

De acuerdo al análisis multivariable (Tabla 6) planteado en la sección 5.3.1.2, los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 11. El resultado del análisis estadístico se presenta en la Figura 7.

Tabla 11. Capacidad antioxidante inicial de vino modelo con ácido cafeico como compuesto polifenólico.

Experimento	pH	C A F (μM)	Fe (μM)	% inhibición DPPH (t=0)
A	3,0	11	30	4,4 ± 1,6
C	3,0	11	0,616	3,2 ± 0,7
D	3,0	56	0,616	2,1 ± 0,2
I	3,0	56	30	6,5 ± 0,3
B	3,5	33	15	3,4 ± 0,6
E	3,5	33	15	5,0 ± 0,5
H	3,5	33	15	4,1 ± 0,2
J	4,0	11	30	2,5 ± 0,7
K	4,0	11	0,616	1,0 ± 0,2
F	4,0	56	0,616	1,7 ± 0,3
G	4,0	56	30	5,1 ± 0,9

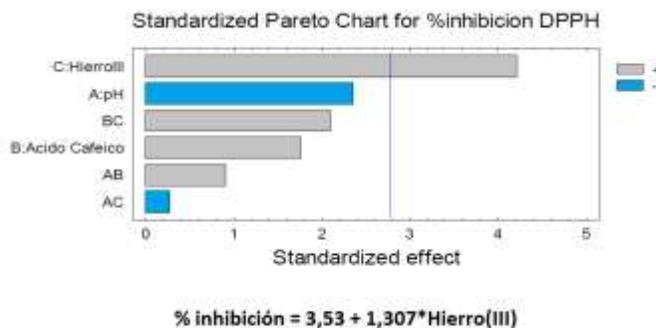


Figura 7. Carta de Pareto para ácido cafeico a tiempo cero. (Donde: A, pH; B, concentración de ácido cafeico; C: concentración de hierro (III); AB, BC, AC interacciones). Además, se presenta la ecuación simplificada del modelo.

Análisis Univariable

Los experimentos con mayor concentración de ácido cafeico (CAF) son I ($6,5 \pm 0,3$), G ($5,1 \pm 0,9$), D ($2,1 \pm 0,2$) y F ($1,7 \pm 0,3$). Este grupo puede dividirse en dos subgrupos, a diferencia de los dos casos anteriores; Subgrupo-1: G e I que presentan en promedio un valor de capacidad antioxidante casi tres veces mayor que el otro subgrupo y G e I poseen la concentración de hierro en su nivel máximo. Esto coincide con los casos de ácido gálico y de catequina. El subgrupo-2: D y F, presentaron en promedio un valor de CA menor y poseen la concentración de hierro en su valor mínimo. De estos dos subgrupos, se puede deducir que solo la cantidad de hierro influye en la capacidad antioxidante, no así el pH. Los experimentos A ($4,4 \pm 1,6$), C ($3,2 \pm 0,7$), J ($2,5 \pm 0,7$) y K ($1,03 \pm 0,2$) poseen concentración de ácido cafeico en su valor mínimo. En este grupo se puede observar que los valores más altos corresponden a los experimentos con pH en su nivel mínimo (pH 3,0), en cambio los valores bajos de capacidad antioxidante, son los que tienen un pH en su nivel más alto (pH 4,0). Aquí no se observan grandes efectos por parte del hierro.

Por lo tanto, de acuerdo a este tipo de análisis, el ácido cafeico presenta un comportamiento diferente a los observados para el ácido gálico y catequina.

Análisis Multivariable

En el diagrama de Pareto de la Figura 7 se observa que la concentración del ácido cafeico no es significativa pero si positiva. La variable estadísticamente significativa fue la concentración de Hierro (III), con una contribución positiva. En los casos anteriores, soluciones modelo de ácido gálico y catequina, el hierro no era una variable significativa y tenía una contribución negativa. La ecuación de este análisis indica que la capacidad antioxidante aumenta en 1,3 unidades cuando la concentración de hierro (III) aumenta desde 0,616 μM (valor mínimo) a 30 μM (valor máximo).

Debido a que los resultados para ácido cafeico no presentaron la misma tendencia que los experimentos realizados con ácido gálico y catequina, se propuso realizar el mismo experimento de ácido cafeico, pero con Hierro (II), siendo éste más redox activo en el mecanismo de oxidación del vino (Figura 4).

De acuerdo al análisis multivariable (Tabla 6) planteado en el punto **5.3.1.2**, los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 12, y el resultado del análisis estadístico se presenta en la Figura 8.

Tabla 12. Capacidad antioxidante inicial de vino modelo con ácido cafeico como compuesto polifenólico y Hierro II.

Experimento	pH	C A F (μM)	Fe II (μM)	% inhibición DPPH (t=0)
A	3,0	11	30	2,1 \pm 0,2
C	3,0	11	0,616	3,9 \pm 0,4
D	3,0	56	0,616	5,0 \pm 0,2
I	3,0	56	30	3,3 \pm 0,2
B	3,5	33	15	3,6 \pm 0,7
E	3,5	33	15	3,5 \pm 0,4
H	3,5	33	15	2,8 \pm 0,7
J	4,0	11	30	2,5 \pm 0,4
K	4,0	11	0,616	0,7 \pm 0,3
F	4,0	56	0,616	2,2 \pm 0,2
G	4,0	56	30	4,3 \pm 0,2

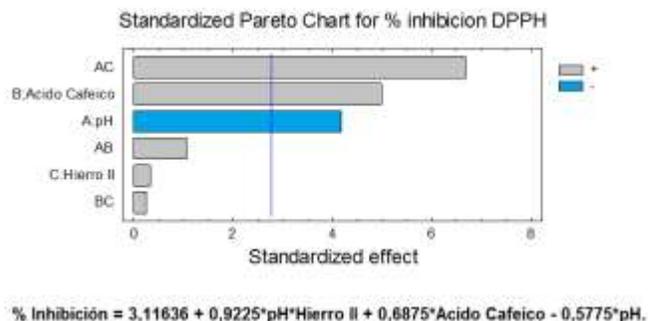


Figura 8. Carta de Pareto para ácido cafeico a tiempo cero. (Donde: A, pH; B, concentración de ácido cafeico; C: concentración de hierro (II); AB, BC, AC interacciones). Además, se presenta la ecuación simplificada del modelo.

Análisis Univariable.

Los experimentos con mayor concentración de ácido cafeico fueron D ($5,02 \pm 0,2$), G ($4,3 \pm 0,2$), I ($3,3 \pm 0,2$) y F ($2,2 \pm 0,2$), de este grupo destaca F ($p < 0,05$), que posee la capacidad antioxidante más baja, con pH en su valor máximo (4,0) y hierro (II) en concentración de $0,616 \mu\text{M}$. Por otra parte, los experimentos con menor concentración de ácido cafeico fueron A ($2,1 \pm 0,2$), C ($3,9 \pm 0,4$), J ($2,5 \pm 0,4$) y K ($0,7 \pm 0,3$), donde destaca K con la menor capacidad antioxidante ($p < 0,05$). El experimento K presenta pH en su mayor valor (4,0) y hierro en su valor mínimo, coincidente con lo que ocurre con el grupo anterior. Se puede apreciar que, a ambas concentraciones de ácido cafeico (mínima y máxima), el pH y el hierro influyen en conjunto sobre la capacidad antioxidante.

Análisis Multivariable

En la Figura 8 se observan tres variables estadísticamente significativas: "A-C" que corresponde a la interacción pH-Hierro(II) con una contribución positiva y corroborado por el análisis univariable, ácido cafeico también con contribución positiva y la variable pH, con contribución negativa.

Comparando el promedio de la capacidad antioxidante de los experimentos con hierro (III) y con hierro (II) se obtiene que este último presenta una CA 13% menor.

Se ha postulado que el hierro (II), en vino modelo, es oxidado por oxígeno para dar hierro (III) y peróxido de hidrógeno (Danilewicz, 2013). En los experimentos de ácido cafeico en vino modelo, el mecanismo de oxidación descrito en vino, se verá afectado, ya que los resultados obtenidos para Fe (III) y Fe (II) no fueron idénticos. En el experimento en vino modelo con Fe (III), la especie predominante sería ésta, ya que no habría cupla redox que permitiera la reducción del Fe (III) para tener Fe (II) en vino modelo y la relación Fe^{2+}/Fe^{3+} sería pequeña. En cambio, en el vino modelo con hierro ferroso, debido a la acción del oxígeno, habría ambas especies presentes, Fe (II) y Fe (III).

Por otra parte, ya que para ácido cafeico con hierro (III) se obtuvo que el hierro era la variable significativa con una contribución positiva, se podría considerar la posibilidad de la formación de un complejo CAF-Fe(III) que afectaría de manera directamente proporcional la capacidad antioxidante. Esto puede corroborarse analizando de manera univariable los experimentos agrupados de acuerdo a su concentración de CAF y de Fe (III), resultando en los pares: I-G, C-K, D-F, A-J. Realizando una relación estequiométrica, se observa que los experimentos que poseen menor capacidad antioxidante son los que, al formar el complejo, dejarían moléculas de ácido cafeico sin complejar. Los experimentos A y J (3:1; CAF:Fe (III)) tendrían formación de complejo casi completa, ya que por cada ácido cafeico habría tres iones de hierro para complejar. Debido a esto, podríamos decir que la formación del complejo aumenta la capacidad antioxidante.

Respecto a cómo se ve afectada la capacidad antioxidante por la complejación de hierro con polifenoles hay resultados opuestos en literatura. De acuerdo a Raza et al., 2016, la capacidad antioxidante por el método DPPH de un complejo de quercetina-hierro (II) posee una capacidad antioxidante mayor a la de quercetina sin complejar. La explicación radicaría en que la habilidad de la quercetina para donar un hidrógeno se reduciría significativamente luego de formar el complejo y, por lo tanto, el mecanismo predominante sería por medio de la donación de electrones (ET). Además, un estudio sobre las propiedades antioxidantes de un complejo de quercetina con cromo (III), indicó que el complejo de cromo era mejor antioxidante

que la quercetina sola. La explicación en este caso, se basa en la entalpía de enlace (BDE) y potencial de ionización (IP) de los compuestos: el complejo poseería menor BDE e IP que la quercetina, indicando que, teóricamente, la actividad antioxidante del complejo es mayor. Sin embargo, la diferencia entre las BDEs es pequeña (0,16 kcal/mol), mientras que la diferencia del potencial de ionización es más significativa (16,41 kcal/mol), indicando que la existencia del ión cromo (III) tiene impacto sobre la habilidad del complejo de donar un electrón (Chen et al., 2009). Sin embargo, en un estudio previo del año 2011, se reportó que la quercetina era mejor antioxidante que su complejo quercetina-hierro(III) por el método DPPH. (Dimitrić Marković et al., 2011). La discordancia de resultados entre este trabajo de tesis y lo encontrado en literatura se podría deber a que los experimentos de esta investigación fueron realizados en diferentes condiciones, por lo tanto, la condición del medio es crucial para la formación de complejos, ya que afecta la relación Fe^{2+}/Fe^{3+} y, como consecuencia, también la variación de la capacidad antioxidante.

Como se mencionó en la discusión de ácido gálico y catequina (sección **6.1.1.1-6.1.1.2**), el ácido tartárico influyó en los resultados de capacidad antioxidante al complejar al hierro (III) presente en el vino modelo. Dado que para los experimentos con ácido cafeico y hierro (III) sólo la variable hierro fue significativa (con una contribución positiva), se podría decir que en este experimento con ácido cafeico la interacción de hierro (III) con ácido tartárico fue diferente.

El ácido cafeico pertenece a la familia de los ácidos hidroxicinámicos, estos se encuentran presentes en uva y vino principalmente en su forma esterificada, particularmente con ácido tartárico (Riberau Gayon, 1965). El ácido caftárico se forma cuando ácido tartárico y ácido cafeico esterifican (Figura III, ANEXOS). Estos ésteres, ácido caftárico, ácido coutárico y ácido fertárico son componentes del jugo de uva, son altamente oxidables y son responsables del *browning* del mosto de vino blanco (Cheynier et al., 1989). La formación del ácido caftárico podría explicar el comportamiento distinto de estos experimentos de ácido cafeico versus los de ácido gálico y catequina en vino modelo. La formación de este ácido podría hacer más favorable la coordinación del Fe (III) en la molécula de ácido caftárico

En el caso del vino modelo con ácido cafeico y hierro (II), por acción del oxígeno, en estos experimentos habría hierro en su estado ferroso y férrico. Probablemente debido a ello, se obtuvo resultados completamente diferentes a los obtenidos en el otro experimento. De acuerdo a Timberlake, 1964, el Fe (II) se une más débilmente que Fe (III) a ácido tartárico para formar un complejo. Esto explicaría por qué no se obtuvo a hierro (II) como variable significativa en el diagrama de Pareto. Además, este fue el único experimento donde se obtuvo más de una variable significativa: la interacción Fe(II)-pH y la concentración de ácido cafeico con contribución positiva y el pH con contribución negativa.

Por otro lado, varios estudios de complejación de compuestos polifenólicos con hierro son evaluados a pH fisiológico, mucho mayor al pH del vino modelo y al del vino real. Estudios realizados en nuestro grupo de investigación demostraron que en buffer fosfato a pH 7,4 existía la formación de un complejo ácido cafeico - hierro (III) del tipo 2:1 (Mura, 2016). En una investigación de complejación de hierro (II) con ácidos fenólicos a pH 7,4 en buffer tris se confirmó, mediante cálculo de constantes de asociación, que los ácidos hidroxicinámicos eran mejores quelantes del hierro (II) que los ácidos hidroxibenzoicos. Además, se reportó que los compuestos carentes de grupo catecol o pirogalol no formaban complejo (Andjelkovic´ et al., 2003). Basándonos en lo anterior, se podría mencionar que los compuestos polifenólicos presentes en cada vino modelo podrían haber quelado al hierro, ya que todos presentaban esos grupos funcionales (AG, pirogalol; CAT y CAF, catecol). Además, según lo descrito por Andjelkovic´ et al., 2003, era más probable la formación de complejos de hierro con el ácido cafeico que con el ácido gálico.

Por lo tanto, podríamos decir que la formación del ácido caftárico influye en la complejación del hierro, debido a que podría complejar en esta por el catecol del ácido cafeico o por el carboxilato e hidroxilo del ácido tartárico.

6.1.1.4 Determinación de la capacidad antioxidante de vinos modelo luego de 20 días.

Además de la medición inicial de capacidad antioxidante a los experimentos, estos fueron almacenados durante veinte días, luego de lo cual se volvió a realizar las mediciones descritas en la sección 5.2.1.1. Esto, para analizar si la oxidación ocurrida durante el almacenaje produjo variaciones en la capacidad antioxidante.

Tabla 13. Resumen comparativo de capacidad antioxidante de soluciones de vino modelo con los diferentes compuestos polifenólicos al día inicial y luego de 20 días.

Experimento	% inhibición AG DPPH (t=0)	% inhibición AG DPPH (t=20 días)	% inhibición CAT DPPH (t=0)	% inhibición CAT DPPH (t=20 días)	% inhibición CAF DPPH (t=0)	% inhibición CAF DPPH (t=20 días)
A	3,6 ± 0,4	3,5 ± 0,2	1,09 ± 0,1	4,0 ± 0,4	4,4 ± 1,6	3,8 ± 0,7
B	4,6 ± 1,2	6,8 ± 0,1	2,3 ± 0,3	5,6 ± 0,5	3,4 ± 0,6	3,4 ± 0,2
C	2,4 ± 0,5	2,9 ± 0,4	0,8 ± 0,6	3,7 ± 0,08	3,2 ± 0,4	1,8 ± 0,2
D	10,6 ± 0,6	11,3 ± 0,4	3,8 ± 0,2	5,9 ± 0,6	2,1 ± 0,2	2,9 ± 0,07
E	4,9 ± 0,1	8,9 ± 0,6	2,3 ± 0,4	2,6 ± 0,06	5,01 ± 0,5	3,8 ± 0,3
F	10,8 ± 0,4	10,1 ± 0,5	3,0 ± 0,4	6,5 ± 0,2	1,7 ± 0,3	2,3 ± 0,3
G	11,1 ± 0,4	12,5 ± 0,5	4,2 ± 0,4	5,1 ± 0,4	5,1 ± 0,9	2,6 ± 0,15
H	4,8 ± 0,3	10,3 ± 0,1	2,7 ± 0,1	6,1 ± 0,7	4,1 ± 0,2	3,32 ± 0,4
I	9,0 ± 0,2	10,5 ± 0,04	2,2 ± 0,03	3,9 ± 0,2	6,5 ± 0,3	3,6 ± 0,3
J	3,4 ± 0,5	3,3 ± 0,3	0,8 ± 0,02	2,1 ± 0,2	2,5 ± 0,7	4,3 ± 0,2
K	2,1 ± 0,1	4,4 ± 0,1	0,7 ± 0,5	2,7 ± 0,03	1,03 ± 0,2	3,1 ± 0,3

Luego de 20 días, se encontró que la capacidad antioxidante de los experimentos centrales B, E y H (pH 3,5; 115 µM de ácido gálico y 15 µM de hierro) de vino modelo con **ácido gálico** aumentaron cerca de un 80%. Los experimentos G e I (alta concentración de AG y alto hierro) presentaron un aumento cercano al 10%. El experimento K, que posee ácido gálico en su concentración mínima (pH 4,0 y 0,616 µM de hierro), fue el que tuvo mayor alza en capacidad antioxidante respecto al día inicial y aumentó al doble. El resto de los experimentos no presentaron diferencias significativas en el tiempo ($p > 0,05$).

Para los experimentos con **catequina** se encontró que la capacidad antioxidante de todos aumentó luego de 20 días, exceptuando E (pH 3,5; 101 µM de CAT y 15 µM de hierro) y G (pH 4,0; 172 µM de CAT y 30 µM de hierro), donde no hubo

diferencias significativas. En la mayoría de experimentos se observó un aumento de más del doble en la capacidad antioxidante, con excepción de los experimentos D e I, los cuales tienen en común el pH en su valor más bajo y la concentración mayor de catequina.

Para el **ácido cafeico**, luego de 20 días, se observó una disminución de la CA a casi la mitad en los experimentos G e I (Subgrupo-2), ambos con alta concentración de CAF y alto hierro, que se diferencian sólo en su valor de pH (G: pH 4,0 e I: pH 3,0). Los experimentos J y K presentaron un aumento de la capacidad antioxidante, estos dos experimentos presentan en común pH 4,0.

De acuerdo a los resultados de los vinos modelo presentados en la Tabla 13, se puede observar que no hay una tendencia clara de CA en ellos al transcurrir el tiempo. Esto podría ser explicado debido a que los complejos fueron formados y almacenados en una solución de vino modelo, donde el pH, concentración de compuestos polifenólicos y hierro eran distintos en cada experimento. Por lo tanto, la estabilidad y solubilidad en cada caso sería distinta, y, bajo ciertas condiciones, la formación del complejo se podría ver perjudicada o favorecida en el tiempo. Además, la degradación de los compuestos polifenólicos libres sería diferente en cada experimento (de A hasta K), lo que se ve reflejado en la variación de capacidad antioxidante en el tiempo.

6.2 Vinos reales.

Debido a que los experimentos en vino modelo no representan en su totalidad los mecanismos de oxidación que ocurren en el vino, se propuso realizar cambios en pH y concentración de hierro en vinos “reales” para evaluar los posibles cambios en su capacidad antioxidante.

Tal como se indicó en la sección de materiales y métodos, en esta parte del estudio se trabajó con un vino Cabernet Sauvignon, dividido en dos grupos: un grupo proveniente de un tratamiento con resina de intercambio iónico (Ion Exchanger I, Merck) (vinos CR) y el otro grupo sin tratamiento (vinos SR). Los vinos SR

presentaron un pH de 3,4 y una concentración de hierro de 1,013 mg L⁻¹. Este mismo vino al ser tratado con resina (vinos CR) presentó un valor de pH de 2,3 y una concentración de hierro de 0,0012 mg L⁻¹. Cada grupo de vinos se constó de tres botellas de 375 mL para realizar mediciones en triplicado, teniendo un total de seis botellas. Se tomó alícuotas de 25 mL de cada vino en matraz de aforo, luego del cambio de pH o modificación de concentración de hierro y posterior análisis de capacidad antioxidante, las muestras fueron vaciadas en viales ámbar de 10 mL y almacenadas en oscuridad a -4°C.

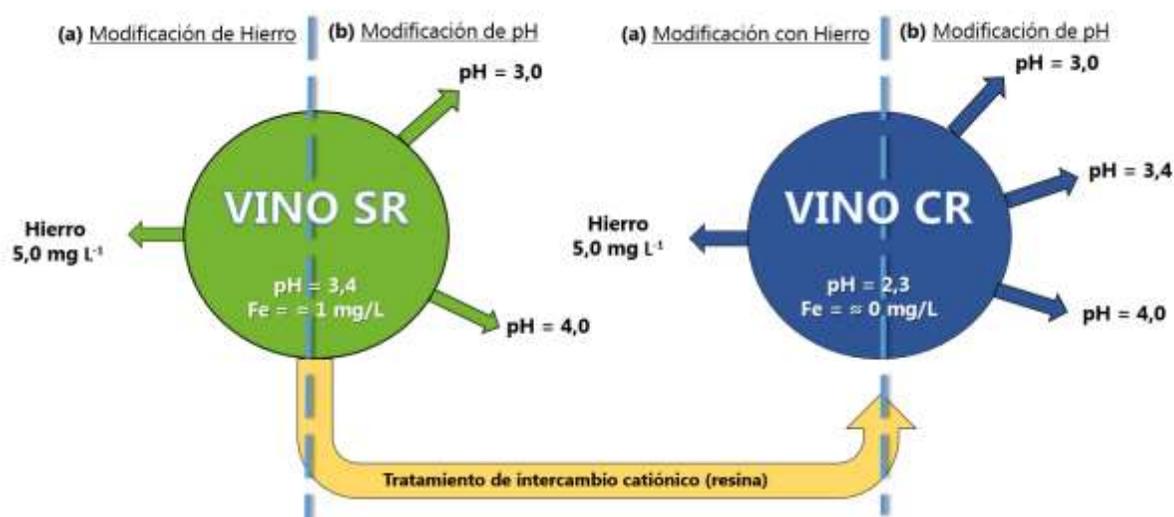


Figura 9. Diagrama de ajuste de Vino SR y vino CR: (a) modificación en el contenido de hierro, (b) modificación de pH.

El objetivo de tratar un vino con resina es disminuir el pH y concentración de metales por medio del intercambio catiónico, conservando -lo más posible- las propiedades de la matriz ya que se modifican ligeramente los aromas, compuestos polifenólicos, entre otros,

Por lo tanto, inicialmente se analizó los polifenoles totales y capacidad antioxidante del mismo vino a distinto pH y distinta concentración de hierro, para ver el efecto de la resina sobre estas propiedades.

6.2.1 Determinación de polifenoles totales por medio de ensayo Folin-Ciocalteu.

Se utilizó el método Folin-Ciocalteu para determinar los polifenoles totales de los vinos iniciales. Estos valores se obtuvieron al interpolar la absorbancia de cada vino en la curva de calibración presentada en Figura 10 y considerando un factor de dilución de 10.

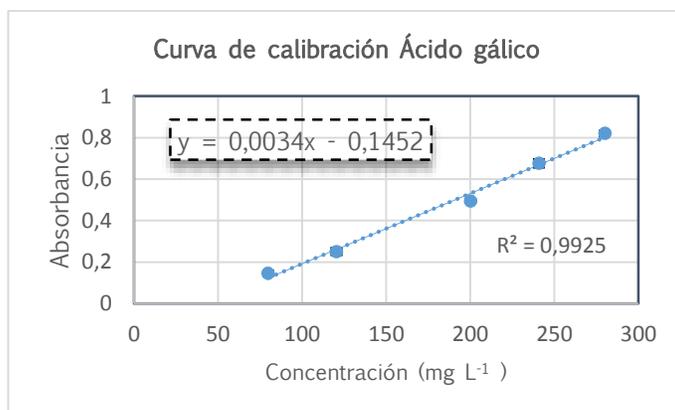


Figura 10. Curva de calibración de ácido gálico.

Para vinos CR (≈ 0 ppm hierro y pH 2,3) se obtuvo un valor promedio de polifenoles totales de 2410 ± 27 mg ácido gálico L⁻¹ y para vinos SR (≈ 1 ppm hierro y pH 3,4) se obtuvo 2508 ± 84 mg ácido gálico L⁻¹ (Figura 11).

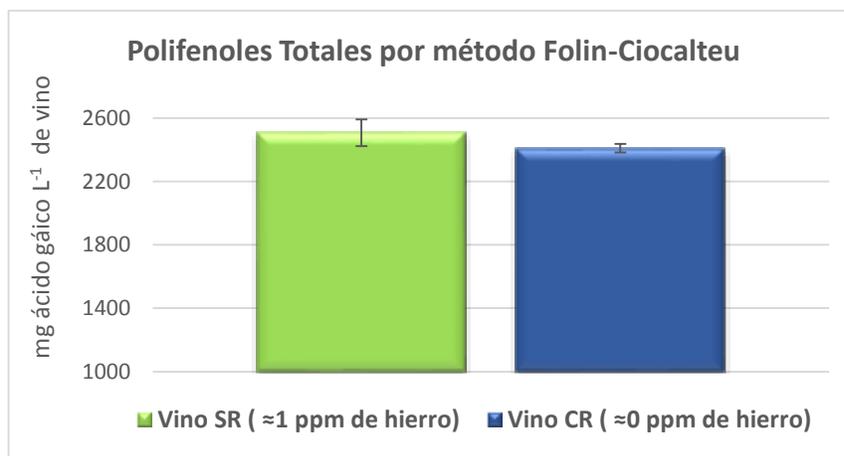


Figura 11. Polifenoles totales por método de Folin-Ciocalteu de los vinos SR (1 ppm de hierro, pH 3,4) y CR (≈ 0 ppm de hierro, pH 2,3).

La diferencia entre ambos vinos puede atribuirse a que en la resina de intercambio iónico, además de quedar retenidos los iones potasio y los metales, también ocurre la adsorción de una pequeña cantidad de compuestos polifenólicos. Sin embargo, esta la diferencia de PT por el método Folin-Ciocalteu entre vinos con tratamiento de resina y sin tratamiento fue no significativa ($p>0,05$). En literatura se han reportado diferencias mayores de PT entre vinos tratados y no tratados con resinas (Lasanta et al., 2013; Ibeas et al., 2015). Ya que la diferencia de PT no fue estadísticamente significativa podemos decir que la matriz del vino no sufrió una gran modificación en su contenido de polifenoles totales.

De acuerdo a Huang et al., 2005, el ensayo de Folin-Ciocalteu mide la capacidad de los compuestos presentes en la muestra para reducir el reactivo a un complejo azul debido a la reacción de transferencia de electrones entre el Mo (IV) y el reductor (Huang et al., 2005). De acuerdo a esto podríamos haber obtenido un valor de PT mayor en vinos SR que en vinos CR, ya que los vinos SR poseían mayor concentración de metales y estos podrían haber actuado como reductores del reactivo.

6.2.2 Determinación de capacidad antioxidante inicial de los vinos SR y vinos CR.

Un vino SR corresponde a un vino que tiene pH 3,4 y una concentración de hierro de ≈ 1 ppm de hierro. Para lograr variar el pH y el contenido de hierro, este vino fue sometido a un tratamiento de resina de intercambio iónico, resultando con un pH de 2,3 y una concentración de hierro cercana a 0 ppm. Además de lo anterior, se evaluó la capacidad antioxidante inicial de estos dos vinos mencionados, por métodos ORAC-FL (Figura 12) y DPPH (Figura 13) a tiempo inicial, siete días y veintiún días.

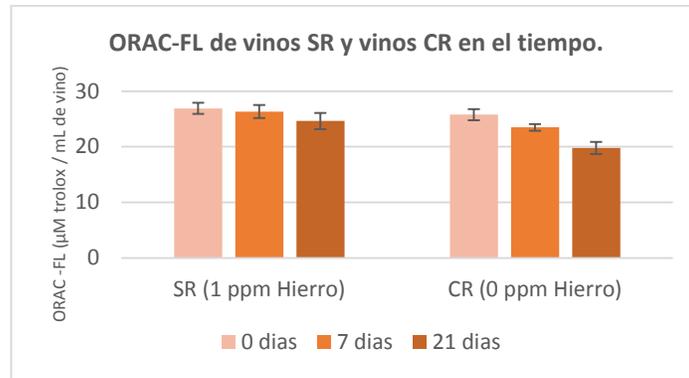


Figura 12. ORAC-FL de vinos SR (1 ppm de hierro, pH 3,4) y CR (\approx 0 ppm de hierro, pH 2,3).

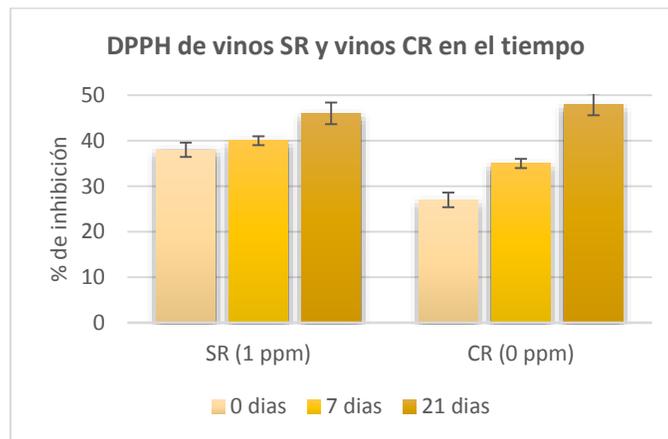


Figura 13. DPPH de vinos SR (1 ppm de hierro, pH 3,4) y CR (\approx 0 ppm de hierro, pH 2,3).

Por el método ORAC-FL, en vino CR, que posee menor concentración de hierro y un valor menor de pH, se observa una disminución de la capacidad antioxidante en el tiempo, lo que podría indicar la ocurrencia de procesos oxidativos en el vino debido al bajo valor de pH y concentración cercana a \approx 0 ppm de hierro. Además, como consecuencia de la baja concentración y casi ausencia de hierro en el vino CR, la formación de complejos de compuestos polifenólicos con este metal se vería restringida, explicando la disminución de la CA en el tiempo. Para el vino SR no se observa diferencias significativas de capacidad antioxidante.

Por otro lado, para el ensayo de DPPH, se observa lo contrario al método anterior, ya que la CA aumenta en el tiempo. Esto puede ser consecuencia de la oxidación del vino, ya que habría formación de complejos de copigmentación. Estos, debido a su carácter más apolar, podrían ser más solubles en etanol que en buffer fosfato pH 7,4 (pH utilizado para ORAC-FL), siendo así detectables por el método DPPH y no por ORAC-FL. La formación de complejos de copigmentación es un fenómeno que ocurre debido a las asociaciones moleculares entre pigmentos (antocianinas) y otras moléculas orgánicas, generalmente no coloreadas, en solución acuosa (Boulton, 2001). Se reportó el mismo fenómeno en un estudio en vinos de mora (*Morus nigra*). En él se observó un aumento en la capacidad antioxidante por el método de DPPH en el tiempo, en un período de uno, tres y doce meses (Tsai et al., 2004). Considerando el valor inicial de cada vino, luego de 21 días, el vino CR aumentó en un 77%, frente al vino SR que aumento 21%. Por esta razón podríamos decir que una baja concentración de Fe y bajo pH, aumenta la oxidación del vino en el tiempo.

6.2.3 Capacidad antioxidante de vinos dopados con hierro.

Para igualar los vinos CR y vinos SR en contenido de hierro se llevó ambos vinos a la concentración máxima de 5 mg L^{-1} , misma concentración de hierro utilizada en los experimentos con vino modelo.

La capacidad antioxidante fue evaluada mediante los métodos ORAC-FL y DPPH al día inicial, día siete y día veintiuno. Los resultados se observan en la Figura 14 y Figura 15.

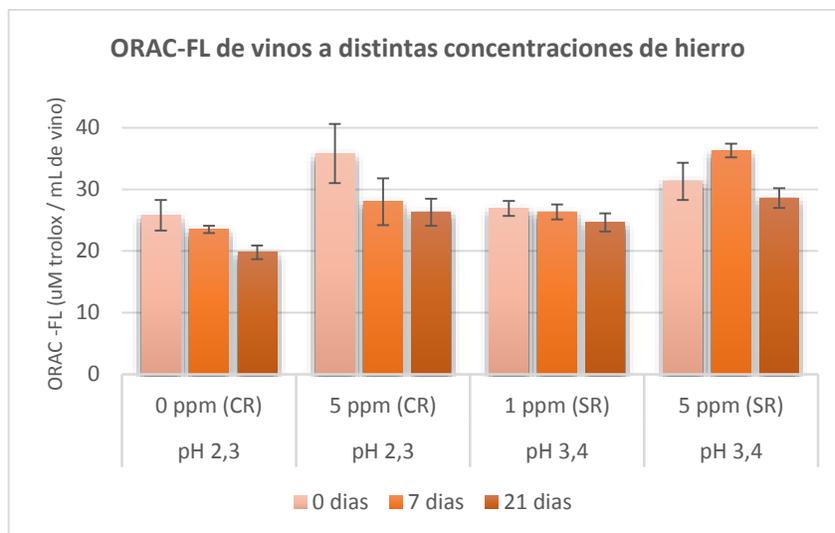


Figura 14. ORAC-FL de vinos CR y vinos SR a diferentes concentraciones de hierro.

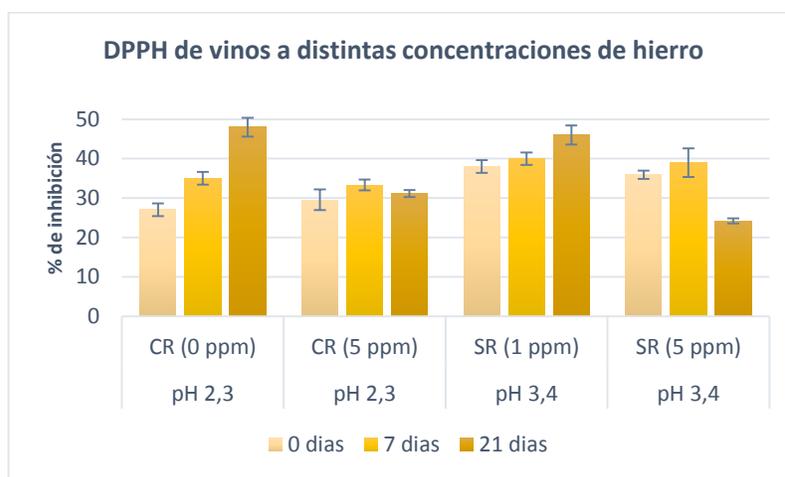


Figura 15. DPPH de vinos CR y vinos SR a diferentes concentraciones de hierro.

De acuerdo a la Figura 14, al fortificar a 5 ppm de hierro el vino con menor pH y menor hierro (Vino CR) se observa un aumento de la capacidad antioxidante por el método ORAC-FL. Esto puede ser producto de la formación de complejos de hierro con los compuestos polifenólicos del vino que poseen grupos catecoles en su estructura. Esto puede ser explicado por los resultados del experimento de vino modelo con ácido cafeico (que posee un catecol), ya que en ese experimento se obtuvo que la única variable estadísticamente significativa, con una contribución positiva, fue el hierro.

La fortificación a 5 ppm de hierro del vino SR (pH 3,4 y ≈ 1 ppm de hierro), produce un aumento de la capacidad antioxidante y, también, produce que la CA disminuya en el tiempo, algo que no ocurría en el vino SR sin fortificar. Debido a esto se podría decir que un exceso de hierro (5 mg L^{-1}) en vinos a pH 3,4 (vino SR) produce una oxidación del vino (ya que disminuye su CA en el tiempo)

Para la metodología de DPPH (Figura 15) hay un comportamiento inverso al método ORAC-FL, como ya fue explicado anteriormente, ya que ambos vinos fortificados presentan una disminución de su CA. El vino CR con 5 ppm de hierro no presenta variación de su capacidad antioxidante en el tiempo, a diferencia del vino CR no fortificado (o sea, con cerca de 1 ppm de hierro). El vino SR con 5 mg L^{-1} de hierro disminuye su capacidad antioxidante en mayor medida que el no fortificado.

El mismo comportamiento se observó en un estudio de fortificación de vinos tintos Cabernet Sauvignon con cobre ($0,6 - 1,2 \text{ mg L}^{-1}$) o hierro ($3,0 - 6,0 \text{ mg L}^{-1}$), donde también se reportó una reducción de la capacidad antioxidante medida por la técnica DPPH. Se asumió que se debía a una interacción entre los metales y los compuestos antioxidantes del vino. (Espinoza et al., 2009). También se demostró una disminución de la capacidad antioxidante por efecto del hierro en un estudio sobre la ingesta de té blanco acompañado de un suplemento de hierro en humanos mediante la técnica FRAP, de mecanismo ET como DPPH. En ese estudio se planteó que el hierro podría modificar las propiedades antioxidantes de los compuestos polifenólicos de té (Karabela et al., 2011).

Las elevadas concentraciones de hierro en vinos CR y SR, provocaron que la CA por el método DPPH disminuyera, posiblemente debido a la complejación de hierro con los compuestos del vino, impidiendo las posibles interacciones entre las moléculas presentes en el vino.

6.2.4 Capacidad antioxidante de vino SR y vino CR luego de modificado su pH.

Se determinó la capacidad antioxidante mediante los métodos ORAC-FL y DPPH de vinos SR (pH 3,4; ≈ 1 ppm de hierro) y CR (pH 2,3; ≈ 0 ppm de hierro) luego de modificado su pH a valores de 3,0; 3,4 y 4,0. Para estudiar su comportamiento en el tiempo, estos vinos fueron medidos a diferentes días: día inicial, siete días y veintiún días. Los resultados se presentan en las Figura 16 y Figura 17.

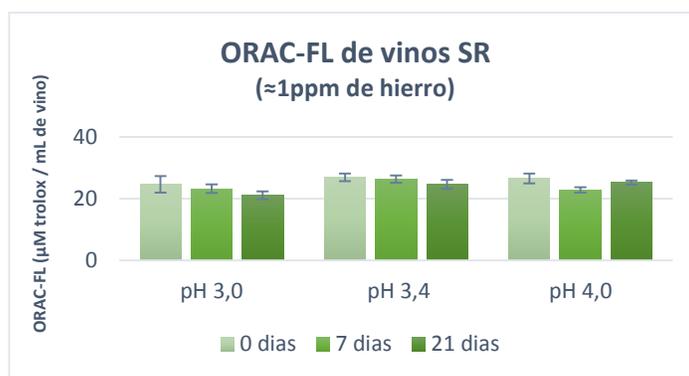


Figura 16. Capacidad antioxidante mediante método ORAC-FL de vinos SR a tiempo inicial, siete días y veintiún días modificados a pH 3,0; 3,4 y 4,0.

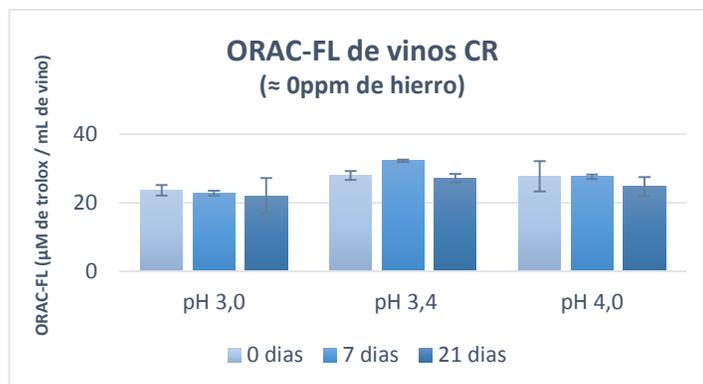


Figura 17. Capacidad antioxidante mediante método ORAC-FL de vinos CR a tiempo inicial, siete días y veintiún días modificados a pH 3,0; 3,4 y 4,0.

Respecto a la Figura 16 se puede observar que no hay diferencias de capacidad antioxidante por ORAC-FL en el tiempo de vinos SR a pH 3,0, pH 3,4 y pH 4,0. A los 21 días se observan diferencias de CA de acuerdo al pH: pH 4,0= 25,2 μM trolox/mL

de vino; pH 3,4= 24,6 μ M trolox/mL de vino y pH 3,0= 21,1 μ M trolox/mL de vino. Por ello, se puede mencionar que en vinos SR a mayor pH hay mayor CA.

En caso de vinos CR (Figura 17), sólo se observan diferencias en capacidad antioxidante en el tiempo para vinos a pH 3,0 y pH 3,4 ($p < 0,05$). A los 7 y 21 días se observan diferencias de CA a pH 3,0 y a pH 3,4, siendo mayor a pH 3,4.

Considerando vinos SR y vinos CR, se podría decir que a mayor pH hay una mayor capacidad antioxidante. Se observó algo similar en un estudio de capacidad antioxidante mediante el método Crocin Bleaching Assay (CBA). En dicho trabajo se estudió flavonoles, flavan-3-oles, ácidos fenólicos y aldehídos en vino modelo a pH 3,5 en buffer fosfato a pH 7,4 y se reportó que la capacidad antioxidante de flavan-3-oles y flavonoles a pH 3,5 era menor a la encontrada a pH 7,4, de esta forma se postuló que la capacidad antioxidante aumenta al aumentar el pH (Di Majo et al., 2011). Se puede considerar como un estudio análogo al ORAC-FL ya que CBA también ocurre mediante mecanismo HAT.

Como se mencionó anteriormente, la capacidad antioxidante también se evaluó por el método DPPH. Los resultados obtenidos se visualizan en las Figura 18 y Figura 19.

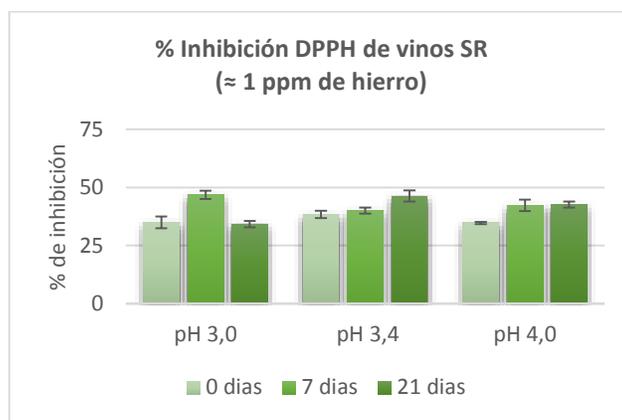


Figura 18. Capacidad antioxidante mediante método DPPH de vinos SR a tiempo inicial, siete días y veintidós días modificados a pH 3,0; 3,4 y 4,0.

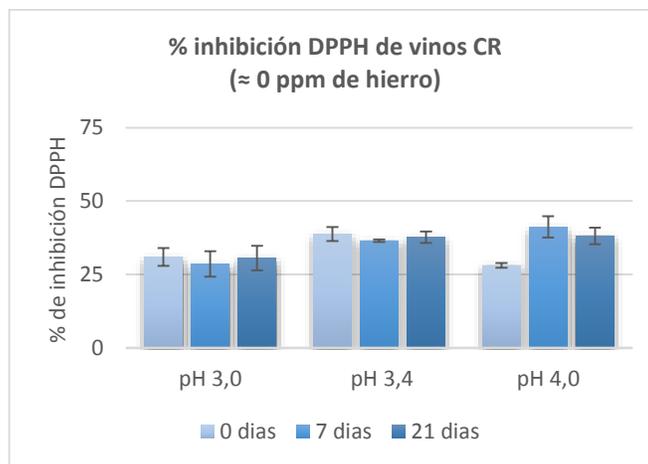


Figura 19. Capacidad antioxidante mediante método DPPH de vinos CR a tiempo inicial, siete días y veintiún días modificados a pH 3,0; 3,4 y 4,0.

En la metodología DPPH se observa un comportamiento distinto al observado con la metodología anterior. Para los vinos SR (≈ 1 ppm de hierro) a pH 3,4 y 4,0 se observa un aumento en la capacidad antioxidante a través del tiempo. En cambio, a pH 3,0 se observa un aumento pronunciado de 11% a los siete días, mientras que una baja de 12% a los veintiún días.

Por otra parte, para los vinos CR no se observó cambios en la CA en el tiempo a pH 3,0 y pH 3,4 ($p < 0,05$). En cambio, a pH 4,0 se observó un aumento de un 47% de CA entre el día inicial y el día siete. De acuerdo a lo observado anteriormente, el aumento de la CA mediante el ensayo de DPPH sería producto de la formación de complejos de copigmentación que ocurren en el vino. Por lo tanto, de acuerdo a la Figura 19, se podría asumir que a pH 4,0, estas reacciones de copigmentación se verían más favorecidas que a pH 3,0 y 3,4.

En un estudio sobre el efecto del pH en la capacidad antioxidante de hidroxiflavonas en buffer fosfato de sodio y fosfato de potasio en rangos de pH 4,5 a 9,5, se observó un aumento de la capacidad antioxidante mediante el método TEAC (mecanismo ET), debido a que la deprotonación de grupos OH favorecía la donación de electrones, comprobando así, que las propiedades antioxidantes y el mecanismo de acción se ve influenciado por el pH (Lemańska et al., 2001).

Por otra parte, como fue mencionado anteriormente, los complejos de copigmentación, son moléculas que resultan de las interacciones entre antocianinas y otros compuestos que se forman en el vino a lo largo del tiempo, podrían solubilizarse mejor en medio etanólico que en buffer fosfato, solventes utilizados en las metodologías empleadas para evaluar capacidad antioxidante. Ello explicaría el aumento de CA en el tiempo por el método DPPH. Ha sido reportado que la formación de complejos de copigmentación en vinos Merlot y Syrah griegos produce una disminución de antocianinas monoméricas de diez veces en un período de 11 meses (Bimpilas et al., 2015). Un trabajo de investigación en vinos Carménère reportó que los pigmentos poliméricos y las antocianinas libres y copigmentadas eran detectadas por el método de DPPH, sugiriendo que la molécula de DPPH reacciona con cadenas poliméricas largas (LPP) por sobre las cadenas poliméricas cortas (SPP). Además, determinó los marcadores químicos contribuyentes a la capacidad antioxidante, dando como resultado que las antocianinas libres y copigmentadas contribuían en la capacidad antioxidante por el método DPPH (39%) y el ácido gálico para el método de ORAC-FL (39,7%) (Zúñiga et al., 2014).

Otra causa de la diferencia en resultados proporcionados por ambas metodologías puede ser debido al mecanismo de acción de cada una. El ensayo de DPPH está basado en un método ET (Transferencia electrónica), donde los antioxidantes son oxidados por el DPPH o por metales, de esta forma se transfiere un electrón desde la molécula de antioxidante hacia el radical libre. En cambio, el método ORAC-FL se basa en mecanismo HAT (Transferencia de átomo de hidrógeno), ya que el radical peroxilo ROO^\bullet generado por termólisis extrae un átomo de hidrógeno desde los antioxidantes. Se han reportado correlaciones sobre $r=0,9$ entre ensayos que poseen el mismo mecanismo, por ejemplo un coeficiente de correlación de $r= 0,92$ entre los resultados de capacidad antioxidante por ensayos FRAP y DDPH, ambos por mecanismo ET. Y correlaciones mucho menores entre ensayos que poseen mecanismos distintos, por ejemplo entre ORAC-FL y DPPH $r=0,69$. (Alañón et al., 2011).

Cada método posee sus ventajas y desventajas, por ejemplo, en el ensayo ORAC-FL los radicales libres (peroxilo) provienen de una fuente controlada (APPH), que es sensible a los cambios de temperatura, ya que los radicales peroxilo se generan debido a la termólisis. Por ello se requiere un control de la temperatura para evitar problemas de reproducibilidad (Lussignoli, 1999). El radical empleado en esta metodología es un radical presente en medio biológico y el solvente utilizado es a pH fisiológico para simular este medio también. Este método puede adaptarse para analizar antioxidantes hidrofílicos e hidrofóbicos empleando soluciones de acetona:agua 50% v/v conteniendo β -ciclodextrina para solubilizar los antioxidantes (Huang et al., 2002; Wu et al., 2004).

Por otra parte, el ensayo DPPH se caracteriza por ser una metodología simple y rápida que se lleva a cabo a temperatura ambiente, evitando la degradación térmica de los antioxidantes. El DPPH puede emplearse en solventes orgánicos no polares y en solventes acuosos y puede usarse con antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos. Se ha reportado que funciona igualmente con metanol o etanol (Cheng et al., 2006). Por lo tanto, este método es capaz de detectar compuestos con carácter más apolar que el ORAC-FL, y en base a esto, son las diferencias presentadas en este trabajo.

7 Conclusiones

De los análisis llevados a cabo en este trabajo se puede concluir que:

Conclusiones del estudio realizado en vinos modelo

- ♦ En los experimentos en vino modelo con ácido gálico (AG) y catequina (CAT) se encontró que la capacidad antioxidante (CA) estaba directamente relacionada a la concentración del compuesto polifenólico con una contribución positiva, sin ser significativas las variables: pH, hierro y la interacción entre ellas. Además, la formación de un complejo de hierro (III) con ácido tartárico explicaría el hecho de que la única variable significativa en estos dos experimentos fue el compuesto polifenólico.
- ♦ Al analizar el efecto del tiempo (20 días) sobre las soluciones de vino modelo con ácido gálico se encontró que los experimentos con los valores medios de cada variable aumentaron su CA y el experimento que poseía alto pH y bajas concentraciones de AG y hierro (III), aumentó su capacidad antioxidante al doble. En general las soluciones de vinos modelo con catequina aumentaron su CA a más del doble.
- ♦ El experimento de vino modelo con ácido cafeico (CAF) presentó resultados diferentes a los de AG y CAT, donde se obtuvo significancia estadística de la concentración hierro (III), con contribución positiva. Por ello, es probable que en este caso la interacción de hierro (III) con el ácido tartárico haya sido diferente, esto podría explicarse debido a la formación de ácido caftárico. Respecto al efecto del tiempo sobre el vino modelo con ácido cafeico con hierro (III), se observó una disminución de 50% en la CA en los experimentos con máximas concentraciones de CAF y hierro.
- ♦ A modo de comparación se realizó el mismo experimento pero con hierro (II), las variables significativas fueron: la interacción pH-hierro (II), la concentración de CAF y el pH, las dos primeras con una contribución positiva y el pH con una contribución negativa. La CA promedio de los experimentos con hierro (II) fue un 13% menor a la CA del experimento con hierro (III). Esta

diferencia podría ser explicada ya que habría mezcla de mecanismos con hierro (II).

Conclusiones del estudio realizado en vinos reales

- ✦ Con relación al contenido de polifenoles totales (PT) medidos por el método de Folin-Ciocalteu no se encontró diferencias significativas entre los vinos SR (sin resina) y vinos CR (con resina), por lo tanto, se puede decir que el tratamiento de resina no afectó el contenido de compuestos polifenólicos en el vino.
- ✦ El vino con 1 ppm de hierro y a pH 3,4 (vino SR), aumentó su CA por el método DPPH, debido a que aumenta la formación de complejos de copigmentación en el tiempo y estos son más solubles en medio etanólico. En cambio, no se observó cambios significativos de la CA en el tiempo para el mismo vino por el método ORAC-FL. El vino real con 0 ppm de hierro y a pH 2,3 (vino CR) presentó un comportamiento similar al vino anterior en el tiempo, aumentando su CA por DPPH, pero por ORAC-FL presentó una disminución significativa de un 23%, después de 21 días.
- ✦ La fortificación de los vinos con hierro (III) resultó en un aumento inicial de un 15% en la capacidad antioxidante mediante el método ORAC-FL en vinos SR y de un 35% en vinos CR. Al realizar la evaluación en el tiempo de los vinos fortificados, a pesar de observar un comportamiento similar, la CA de estos, en general, fue mayor a los no fortificados con hierro. Esto podría ser consecuencia de la formación de complejos de hierro con los compuestos polifenólicos en el vino y se correlaciona con los resultados de ácido cafeico en vino modelo, donde el hierro (III) fue una variable estadísticamente significativa y con contribución positiva. Por otra parte, se observa que una alta concentración de hierro (5 mg L^{-1}) en vinos a pH 3,4 produce una oxidación del vino en el tiempo ya que su CA disminuye, a diferencia de los otros dos pH estudiados.

- ♦ La capacidad antioxidante mediante DPPH indicó lo contrario al método ORAC-FL. Mediante ese método la CA disminuyó luego de fortificar los vinos a 5 mg L^{-1} de hierro. El vino fortificado y con pH 2,3 mantuvo su capacidad antioxidante al transcurrir el tiempo, en cambio, el vino fortificado a pH 3,4 disminuyó su CA en un 32% luego de 21 días. Este comportamiento también puede ser explicado por la formación de complejos, ya que estos podrían impedir la formación de complejos de copigmentación, como ocurrió en el vino inicial con baja concentración de hierro. Quizás los diferentes pH, afectan la formación de complejos y esto podría explicar la diferencia.
- ♦ Mediante el método DPPH se encontró diferencias de CA de acuerdo al pH de los vinos. En vinos con \uparrow 1 ppm de hierro y a pH 3,4 (vinos SR), a mayor pH, mayor es la CA y al transcurrir el tiempo sólo la CA de vinos a pH 3,4 y 4,0 presentó un aumento. En vinos CR no se observó cambios de su CA en el tiempo. La CA por medio del método ORAC-FL en vinos SR no presentó diferencias a los tres pH estudiados. La CA en vinos CR fue mayor a pH 3,4 que a pH 3,0 por el mismo método.
- ♦ En general de este trabajo podemos concluir que, de acuerdo al estudio en vino modelo y vino tinto real la variación del pH no tiene grandes efectos sobre la capacidad antioxidante. Por otro lado, la concentración de hierro sí tendría un efecto sobre la capacidad antioxidante.

8 Referencias

- ♦ Al Attrach, F.S. “Exportación del vino chileno: la estrategia de la asociación gremial vinos – Chile A.G”. 2015. Caso de estudio para optar al grado de Magíster en Estrategia Internacional y Política Comercial. Santiago de Chile. Universidad De Chile. Instituto De Estudios Internacionales. Pag 7.
- ♦ Alam, N., Jahan, N., Rafiquzzaman, Z. “Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity”. Saudi Pharmaceutical Journal. 2013. 21, 143–152.
- ♦ Alañón, M., Castro, L., Díaz, M., Gordon, M., Pérez, M. “A study of the antioxidant capacity of oak wood used in wine ageing and the correlation with polyphenol composition”. Food Chemistry. 2011. 128, 997–1002.
- ♦ Andjelkovic, M., Van Camp, J., De Meulenaer, B. “Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups”. Food Chemistry. 2006. 98, 23–31
- ♦ AWRI, The Australian Wine Research Institute. “Copper Instability”. [en línea] https://www.awri.com.au/industry_support/winemaking_resources/fining-stabilities/hazes_and_deposits/copper_instability/ [consulta : 24 de mayo 2017]
- ♦ Benitez, R. Castro, J. Sanchez Pazo, C., Barroso, G. “Influence of metallic content of fino sherry wine on its susceptibility to browning”. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002. 35: 785–791.
- ♦ Bimpilas, A., Tsimogiannis, D, Balta-Brouma, K., Lymperopoulou, T. “Evolution of phenolic compounds and metal content of wine during alcoholic fermentation and storage”. Food Chemistry. 2015. 178, 164–171.
- ♦ Boulton, R. “The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review”. The American Journal of Enology and Viticulture. 2001, 52:2.
- ♦ Boulton, R., Singleton, V., Bisson, L., Kunkee, R. “Principles and Practices of Winemaking”, New York, Chapman & Hall. 1996.
- ♦ Bourzeix, M., Weyland, D., Heredia, N., and Desfeux, N. “A study of catechins and procyanidins of grape clusters, of wine and other by-products of wine”. Bulletin de l'O.I.V. 1986. 59, 1171–1254.
- ♦ Burns J., Gardner P., O'Neil J., Crawford S., Morecroft I., McPhail D., Lister C., Matthews D., MacLean M., Lean M., Duthie G., Crozier A. “Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines”. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2000. 48:220-30
- ♦ Chatonnet, P. “Informe Técnico: Gestión de pH en el vino de calidad” Capítulo 1: “Origen, importancia y factores de variación de la acidez y del pH: visión general de la problemática de la disminución de la acidez de los vinos”. 2005. Edita Fundación para la Cultura del Vino. Madrid.

- ◆ Cheeseman, K., Slater, T. "An introduction to free radical biochemistry". *British Medical Bulletin*. 1993. Jul; 49(3):481-93.
- ◆ Chen, W., Sun, S., Wei, J., Liang, Y. "Antioxidant property of quercetin–Cr(III) complex: The role of Cr(III) ion". *Journal of Molecular Structure*. 2009. 918, 194–197.
- ◆ Cheng, Z., Moore J., Yu L. "High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006. 54(20):7429-36.
- ◆ Cheyner, V., Rigaud, J., Souquet, J.M., Brillere y Moutounet, M. "Effect of pomace contact and hiperoxidation on the phenolic composition and quality of grenache and chardonnay wines". *American Journal of Enology and Viticulture*. 1989. 40:36.
- ◆ Cvetkovic, S. Arpadjan, I. Karadjova, T. Stafilov. "Determination of cadmium in wine by electrothermal atomic absorption spectrometry". *Acta Pharmaceutica*. 2006. 56, 69-77.
- ◆ Danilewicz, J. "Interaction of Sulfur Dioxide, Polyphenols, and Oxygen in a Wine-Model System: Central Role of Iron and Copper". *American Journal of Enology and Viticulture*. 2007. 58:1.
- ◆ Danilewicz, J. "Reactions Involving Iron in Mediating Catechol Oxidation in Model Wine". *American Journal of Enology and Viticulture*. 2013. 64:3.
- ◆ Danilewicz, J. "Review of Reaction Mechanisms of Oxygen and Proposed Intermediate Reduction Products in Wine: Central Role of Iron and Copper" *American Journal of Enology and Viticulture*. 2003. 54, 73-85.
- ◆ Danilewicz, J. "Role of Tartaric and Malic Acids in Wine Oxidation" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014. 62, 5149–5155.
- ◆ Di Majo, D., La Neve, L., La Guardia, M., Casuccio, A., Giammanco, M. "The influence of two different pH levels on the antioxidant properties of flavonols, flavan-3-ols, phenolic acids and aldehyde compounds analysed in synthetic wine and in a phosphate buffer". *Journal of Food Composition and Analysis*. 2011. 24, 265–269
- ◆ Dimitric, J., Markovic, S., Brdaric, TP., Pavelkic, V. "Iron complexes of dietary flavonoids: Combined spectroscopic and mechanistic study of their free radical scavenging activity". *Food Chemistry* 2011. 129,1567–1577.
- ◆ Elhabiri, M., Carrer, C., Marmolle, F., Traboulsi, H. "Complexation of iron (III) by catecholate-type polyphenols". *Inorganica Chimica Acta*. 2007. 360, 353–359.
- ◆ Elias, R., Mogens, A., Leif H., Waterhouse, A. "Identification of Free Radical Intermediates in Oxidized Wine Using Electron Paramagnetic Resonance Spin Trapping". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009. 57 (10), 4359–4365.

- ◆ Elias, R., Waterhouse, A. "Controlling the Fenton Reaction in Wine". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010. 58, 1699–1707.
- ◆ Espinoza, M., Olea, C., Speisky, H., Rodríguez, J. "Determination of reactions between free radicals and selected Chilean wines and transition metals by ESR and UV–vis technique". *Spectrochimica Acta Part A*. 2009, 71, 1638–1643.
- ◆ Fazary, A., Taha, M., Ju, Yi-Hsu. "Iron Complexation Studies of Gallic Acid". *Journal of Chemical & Engineering Data*. 2009, 54, 35–42.
- ◆ Fernández Pachón MS., D. Villaño, MC. García-Parrilla, AM. Troncoso. "Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition". *Analytica Chimica Acta*. 2004, 513: 113-118.
- ◆ Frankel, E., Waterhouse, A., Teissedre, P. "Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1995. 43, 890-894.
- ◆ Galani-Nikolakaki N, Kallithrakas-Kontos N, Katsanos AA. "Trace element analysis of Cretan wines and wine products". *Science of the Total Environment*. 2002. 285(1-3):155-63.
- ◆ Galleano, M., Verstraeten, SV., Oteiza, PI., Fraga, CG. "Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis". *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2010. Sep 1; 501(1):23-30.
- ◆ Gambelli L., Santaroni G.P. "Polyphenols content in some Italian red wines of different geographical origins". *Journal of Food Composition and Analysis*. 2004. 17, 613-618.
- ◆ Garcia, R., Mudarra, I. "Buenas prácticas en producción ecológica: Cultivo de la Vid" [en línea]
[www.mapama.gob.es/es/ministerio/servicios/.../cultivo de la vid tcm7-187417.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/ministerio/servicios/.../cultivo_de_la_vid_tcm7-187417.pdf) pág 21-23. [consulta : 24 de julio 2017]
- ◆ Gichner T., Pospisil, F., Veleminsky, J., Volkeova, V., Volke, J. "Two types of antimutagenic effects of gallic and tannic acids towards N-nitroso-compounds-induced mutagenicity in the Ames Salmonella assay". *Folia Microbiologica*. 1987. 32, 55–62.
- ◆ Gonzalez Hernandez, A. Hardisson de la Torre, J.J. Arias Leon., "Quantity of K, Ca, Na, Mg, Fe, Cu, Pb, Zn and ashes in DOC Tacoronte-Acentejo (Canary Islands, Spain) musts and wines". *Z Lebensm Unters Forsch*. 1996. 203(6):517-21.
- ◆ Gorinstein, S., Zemser, M., Weinsz. M., Halevy, S., Martin-Beloso, O., Trankhtenberg, S. "The influence of alcohol-containing and alcohol-free beverages on lipid levels and lipid hydroperoxides in serum of rats". *Journal of Nutrition Biochemistry*. 1998. 9, 682-686.

- ◆ Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. "Free Radicals in Biology and Medicine". 3rd Edition, Oxford University Press, Oxford. 1999.
- ◆ Halliwell. "How to characterize an antioxidant: an update" Biochemical Society Symposia. 1995. 61, 73-101.
- ◆ Haslam, E. "Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action". Cambridge, Cambridge University Press. 1998.
- ◆ Hernández-Colorado, R., Alvarado, A., Romero, R. "Acumulación de cobre en plantas silvestres de zonas agrícolas contaminadas con el metal". Ciencia y Tecnología. 2012. 28(1 y 2): 55-61.
- ◆ Huang, D., Ou B., Prior R. "The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays". Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005, 53: 1841–1856.
- ◆ Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Prior, R. "High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format". Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002. 50, 4437-4444.
- ◆ Ibeas, V., Correia, A., Jordão, A. "Wine tartrate stabilization by different levels of cation exchange resin treatments: impact on chemical composition, phenolic profile and organoleptic properties of red wines". Food Research International. 2015. 69, 364–372.
- ◆ Jackson, R. "Wine Science: Principles and Applications". 2008. 3era edición. Elsevier Inc.
- ◆ Jandera, P., Skerikova, V., Rehova, L., Hajek, T., Baldrianova, L., Skopova, G., Kellner V., Horna A. "RP-HPLC analysis of phenolic compounds and flavonoids in beverages and plant extracts using a CoulArray detector". Journal of Separation Science. 2005. 28, 1005-1022.
- ◆ Kallithraka, S., Bakker, J., Clifford, M. "Effect of pH on Astringency in Model Solutions and Wines". Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1997. 45, 2211-2216.
- ◆ Karabela, D., Koutelidakis, A., Proestos, C., Komaitis, M., Kapsokefalou, M. "Ingesting iron together with white tea (Camellia Sinensis) may decrease its antioxidant capacity and phenolic content in human plasma". Trace Elements and Electrolytes. 2011. 29, 10.5414/TEX01208.
- ◆ Kilinc E., Kalkan H. "High-performance liquid chromatographic determination of some phenolic acids of Turkish commercial wines: an electrochemical approach". Journal of Wine Research. 2003. 14, 17-23.
- ◆ Kim D., Lee K.W, H.J. Lee, C.Y. Lee. "Vitamin C equivalent antioxidant capacity of phenolic phytochemicals" Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002. 50, 3713–3717.

- ◆ Kreitman G., Cantu, A., Waterhouse, A., Elias, R. "Effect of Metal Chelators on the Oxidative Stability of Model Wine". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013. 61, 9480–9487.
- ◆ Lasanta, C., Caro, I., Pérez, L. "The influence of cation exchange treatment on the final characteristics of red wines". *Food Chemistry*. 2013. 138, 1072–1078.
- ◆ Laurie, V F., Clark, A C. "Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications Volume 2: Management in different industry sectors". Woodhead Publishing Limited. 2010. Capítulo 14, 445-467.
- ◆ Lemanska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zielinski, R., Rietjens, I. "The Influence of pH on Antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones". *Free Radical Biology & Medicine*. 2001. Vol. 31, No. 7, 869–881.
- ◆ Lussignoli, S., Fraccaroli, M., Andrioli, G., Brocco, G., Bellavite, P. "A microplate-based colorimetric assay of the total peroxy radical trapping capability of human plasma". *Analytical Biochemistry*. 1999. 269, 38-44.
- ◆ McArdle, J., Hoffmann, M. "Kinetics and mechanism of the oxidation of aquated sulfur dioxide by hydrogen peroxide at low pH". *The Journal of Physical Chemistry A*. 1983. 87, 5425-5429.
- ◆ Minussi R., Rossi M., Bologna L., Cordi L., Rotilio D., Pastore G., Duran N. "Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines". *Food Chemistry*. 2003. 82, 409-416.
- ◆ Mirabel, C. Saucier, C. Guerra, And Y. Glories. "Copigmentation in Model Wine Solutions: Occurrence and Relation to Wine Aging". *The American Journal of Enology and Viticulture*. 1999. Vol. 50, No. 2.
- ◆ Moran, J., Klucas, R., Grayer, R., Abian, J., Becana, M. "Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: Prooxidant and antioxidant properties". *Free Radical Biology & Medicine*. 1997. Vol. 22, No. 5, 861–870.
- ◆ Mura, F. "Estudio de la actividad antioxidante y potencial capacidad citotóxica en células leucémicas de la línea HL-60 de nuevos compuestos derivados de ácido hidroxicinámico". Memoria para optar al grado de Doctor en Química. Santiago. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 2016. 128-131.
- ◆ Nigdikar, S., Wichians, N., Griffin, B, Howard, A. "Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo". *American Journal of Clinical Nutrition*. 1998. 68, 1081-1087.
- ◆ Nikolantonaki, M., Chichuc, I., Teissedre, P., Darriet, P. "Reactivity of volatile thiols with polyphenols in a wine-model medium: Impact of oxygen, iron, and sulfur dioxide". *Analytica Chimica Acta*. 2010. 660, 102–109.
- ◆ Ojeda, H. "Los compuestos fenólicos de la uva". *Revista Enología* N°4. 2007. Año IV Setiembre-Octubre.

- ◆ Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R. "Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe". *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 4619-4926.
- ◆ Ou, B., Prior, R., Huang, D. "The chemistry behind dietary antioxidant capacity assays". *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2005. 53, 1841-1856.
- ◆ Pannala A., Chan, T., O'Brien, P., Rice-Evans, C. "Flavonoid B-ring chemistry antioxidant activity: fast-reaction kinetics". *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2001. 282, 1161-1168.
- ◆ Pascual, T., Santos, B, Rivas, G., "Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages". *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2000. 4, 5331-5337.
- ◆ Pohl, P. "What do metals tell us about wine?". *Trends in Analytical Chemistry.* 2007. Vol. 26, No. 9.
- ◆ Prior, R., Hoang, H., Gu, L. "Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC -FL) of plasma and other biological and food samples". *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2003. 51, 3273–3279.
- ◆ Prior, R., Xianli W, Schaich, K. "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements" U.S. Department of Agriculture, Arkansas Children's Nutrition Center, 1120 Marshall Street, Little Rock, Arkansas 72202, and Department of Food Science, Rutgers University, 2005.
- ◆ Priscilla, H., Prince, S. "Cardioprotective effect of gallic acid on cardiac troponin-T, cardiac marker enzymes, lipid peroxidation products and antioxidants in experimentally induced myocardial infarction in Wistar rats" *Chemico-Biological Interactions.* 2009. 179, 118–124.
- ◆ Raza, A., Xu, X., Xia, L., Xia, C., Tang, J., Ouyang, Z. "Quercetin-iron complex: synthesis, characterization, antioxidant, DNA Binding, DNA cleavage and Antibacterial Activity Studies" *Journal of Fluorescence.* 2016. 26, 2023–2031.
- ◆ Ribéreau-Gayon, P., Glories Y., Maujean A., Dubourdiou, D. "Handbook of Enology: Chemistry of Wine Stabilization and Treatments". 2006. Cap 4.6 y 4.7.
- ◆ Ribéreau-Gayon, P., Sapis, J. "On the presence in wine of tyrosol, tryptophol, phenylethyl alcohol and gamma-butyrolactone, secondary products of alcoholic fermentation". *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles.* 1965. 261 (8), 1915–6.
- ◆ Robbins R., Bean S. "Development of a quantitative high-performance liquid chromatography-photodiode array detection measurement system for phenolic acids". *Journal of Chromatography A.* 2004. 1038, 97-105.

- ◆ Rodriguez M., Gonzalez, G., Conde, J., Perez, J. "Principal component analysis of the polyphenol content in young red wines". *Food Chemistry*. 2002. 78, 523-532.
- ◆ Romeyer F., Macheix, J., Goiffon, J., Reminiac, C., Sapis, J. "The browning capacity of grapes. 3. Changes and importance of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters during development and maturation of the fruit". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1983. 31, 339-346.
- ◆ Rossouw, M., Marais, J. "The phenolic composition of South African Pinotage, Shiraz and Cabernet Sauvignon wines". *South African Journal of Enology and Viticulture*. 2004. 25, 94-104.
- ◆ SAG, Servicio Agrícola y Ganadero: División Protección Agrícola y Forestal, 2016. "Informe Ejecutivo Producción de Vinos 2016". Departamento de Regulación y Control de Insumos y Productos Silvoagrícolas Avenida Presidente Bulnes 140, piso 3. Santiago, Chile.
- ◆ Sartor, V., Henderson, P., Schuster, G. "Radical cation transport and reaction in RNA/DNA hybrid duplexes: effect of global structure on reactivity". *Journal of the American Chemical Society*. 1999. 121, 11027-11033.
- ◆ Sonni, F., Clark, A., Prenzler, P., Riponi, C., Scollary, G. "Antioxidant action of glutathione and the ascorbic acid/glutathione pair in a model white wine". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011. 59, 3940–3949.
- ◆ Timberlake, C. "Iron-tartrate complexes". *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. 1964. 242, 1229-1240.
- ◆ Tsai, P., Huang, H., Chi, H., Tzou. "Relationship between anthocyanin patterns and antioxidant capacity in mulberry wine during storage" *Journal of Food Quality*. 2004. 27, 497–505.
- ◆ Waterhouse, A. "Folin-Ciocalteu Micro Method for Total Phenol in Wine" (en línea) <http://waterhouse.ucdavis.edu/faqs/folin-ciocalteu-micro-method-for-total-phenol-in-wine> [consulta : 26 de junio 2017]
- ◆ Waterhouse, A., Laurie, VF. "Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypothesis". *American Journal of Enology and Viticulture*. 2006. 57, 306–313.
- ◆ Wright, J., Johnson, E., DiLabio, G. "Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants". *Journal of the American Chemical Society*. 2001. 123, 1173-1183.
- ◆ Wu, X., Gu, L., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., Beecher, G., Prior, R. "Factors in the development of a database of food total antioxidant capacity using lipophilic and hydrophilic oxygen radical absorbance capacity (ORAC-FL): a preliminary study of 28 foods". *Journal of Food Composition and Analysis*. 2004. 17, 407-422.

- ♦ Zuñiga, MC., Perez, R., Olea, C., Laurie, VF., Agosin, E. "Contribution of metals, sulfur-dioxide and phenolic compounds to the antioxidant capacity of Carmenere wines" *Journal of Food Composition and Analysis*. 2014. 35, 37–43.

9 ANEXOS.



Figura I. Estructuras químicas de los compuestos polifenólicos estudiados. (a) Ácido gálico: no flavonoide, familia de los ácidos benzoicos; (b) Catequina: flavonoide, familia de los flavan-3-oles; (c) Ácido cafeico: no flavonoide, familia de los ácidos hidroxicinámicos.

Tabla I.

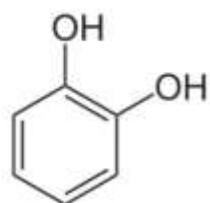
Nombre	Ion Exchanger I
Tipo	Intercambiador de cationes fuertemente ácido en forma de H ⁺ .
Apariencia	Marrón amarillento
Capacidad de intercambio	>1,7 mol L ⁻¹
Capacidad de intercambio (calculada en sustancia seca)	4.5 – 5
Densidad aparente	850 kg/m ³

Características de la resina empleada. (Datos extraídos de la información del producto)

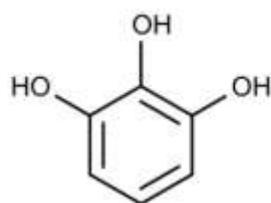
Tabla II. Procedimientos para el uso de resina de intercambio catiónico.

Paso	Procedimiento	Agente utilizado	Cantidad (mL)
1	Llenado de la columna con resina	Resina de intercambio catiónico	100
2	Regeneración de la resina	Ácido sulfúrico al 20%	12,5

3	Lavado	Agua destilada	100
4	Avinado	Vino de trabajo	25
5	Vino a tratar	Vino de trabajo	1000



(a) catecol



(b) pirogalol

Figura II. Estructuras químicas de catecol y pirogalol.

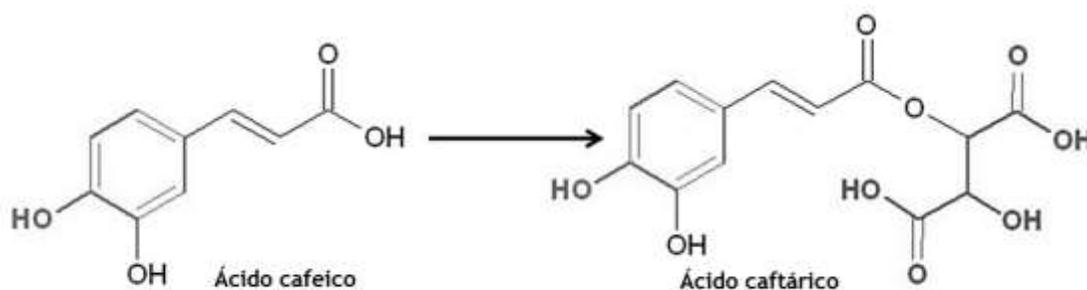


Figura III. Estructuras químicas de ácido cafeico y su posterior esterificación a ácido caftárico.