



DETERMINACIÓN VOLTAMPEROMÉTRICA DE HIERRO EN VINOS

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Curso: 2016/17

Alumno: MARÍA ELVIRA GARCÍA VÍTORES
Tutor: DANIEL SANCHO RINCON

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

Determinación voltamperométrica de hierro en vinos

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

RESUMEN

En los últimos años el consumo de vino ha ido en aumento. Razón por la que los productores de vino se esfuerzan en obtener vinos de alta calidad. Uno de los parámetros a analizar para obtener el mejor producto es la presencia de hierro ya que puede generar la precipitación de la materia colorante y por tanto, la turbidez en los vinos, alterando su aspecto visual.

Es por ello, que aunque ya se han desarrollado numerosos métodos analíticos para la detección de hierro en vinos, como la espectrometría, fluorescencia de rayos X, cromatografía o alguno más novedoso como una lengua electrónica, cuyos resultados han sido exitosos; se han revisado los diferentes métodos voltamperométricos utilizados para la detección de hierro y otros metales en vino, y también en otras bebidas, cuyo funcionamiento, pueda ser útil para la aplicación en el vino. Consiguiendo un análisis más rápido, eficaz y de bajo coste.

Palabras clave: vino, hierro, voltamperometría, métodos analíticos, metales, bebidas.

ABSTRACT

In the last years, the consumption of wine has increased. For this reason, wine producers make an effort to obtain high quality wines. One of the parameters analyzed to obtain the best product is the presence of iron, since it could trigger the fall of the colouring matter and therefore, the sediment in the wines, altering its look.

Because of this, even though numerous scientific methods have been developed to detect iron in wines, such as spectrometry, X-ray fluorescence, chromatography or more novel ones like electronic tongue whose results have been successful; the different voltammetric methods used to detect iron and other metals in wine and other beverages have been re-examined resulting in a more efficient, quicker and low cost analysis.

Keywords: wine, iron, voltammetry, analytical methods, metals, beverages.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. LA INFLUENCIA DEL HIERRO EN EL VINO.....	1
3. ¿QUÉ ES LA VOLTAMPEROMETRÍA?.....	2
4. DETERMINACIÓN DE HIERRO EN BEBIDAS.....	3
5. DETERMINACIÓN DE HIERRO EN VINO.....	4
6. DETERMINACIÓN DE HIERRO EN AGUA MEDIANTE MÉTODOS VOLTAMPEROMÉTRICOS	7
7. DETECCIÓN DE HIERRO EN CERVEZA MEDIANTE MÉTODOS VOLTAMPEROMÉTRICOS	9
8. DETECCIÓN DE METALES, DIFERENTES AL HIERRO, MEDIANTE VOLTAMPEROMETRÍA EN VINO	11
9. DETECCIÓN DE HIERRO EN VINO POR VOLTAMPEROMETRÍA	13
10. CONCLUSIONES	13
11. BIBLIOGRAFÍA	14

1. INTRODUCCIÓN

El consumo de vino ha ido en aumento de forma globalizada en los últimos años, sobre todo entre el segmento de la población joven y adulta, lo que indica que están desarrollándose nuevas tendencias que están haciendo del vino de calidad, una bebida indispensable en diversos contextos.

La calidad de los vinos y sus propiedades organolépticas, pueden verse influenciados por los compuestos inorgánicos que contienen. La presencia de estos iones puede deberse tanto a la composición natural, como a los proceden del proceso de fabricación. Por esta razón, es importante la determinación de algunas especies metálicas.

El hierro en los vinos puede encontrarse según su nivel de oxidación bajo dos formas, oxidada o férrica (Fe^{+3}) o reducida y ferrosa (Fe^{+2}); pudiéndose encontrar además en forma iónica o disociada formando parte del contenido en sales minerales del mosto y del vino. La mayor parte del hierro está en forma de complejos con los ácidos orgánicos que contiene el mosto, es decir, junto al ácido málico, tartárico y cítrico. Se sabe que la presencia de hierro (Fe) afecta al desarrollo del vino en botella, al influir en la actividad oxidativa o a la evolución reductiva del vino y/o a su turbidez [1-4].

Si hablamos de la influencia oxidativa, el hierro acelera el consumo de oxígeno en el vino, lo que se traduce en una pérdida de dióxido de azufre, y a su vez, en la liberación de compuestos aromáticos, tales como fenilacetaldehído [5-6]; y además participa en procesos fotoquímicos.

El hierro muestra la importancia de los ácidos orgánicos específicos, como el tartárico, sobre la capacidad del hierro para catalizar la oxidación del vino. Las concentraciones de Fe encontradas en el vino varían de 0,7 a 23,0 mg / L.

2. LA INFLUENCIA DEL HIERRO EN EL VINO

La presencia de hierro en el vino es importante, ya que puede causar turbidez o un cambio de color cuando está presente en exceso.

El contenido en hierro del vino puede proceder de los siguientes factores:

- Hierro biológico: depende de la variedad de uva y de los tratamientos mecánicos que se le hayan aplicado (la sobrepresión aumenta el Fe).
- Hierro agronómico: procede de las partículas terrosas adheridas a la uva.

Determinación voltamperométrica de hierro en vinos

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

- Hierro tecnológico: procedente del material, en caso de utilización de maquinaria de hierro y acero sin proteger. Pero es despreciable si se utiliza acero inoxidable o revestido.

Si el vino se mantiene con un contenido bajo en hierro, el cual se encuentra en un medio reductor, estará exclusivamente como hierro (II) y este será soluble incluso si está presente en grandes cantidades. Sin embargo, cuando el vino es aireado, el oxígeno disuelto oxida el hierro (II) pasando a hierro (III), el cual es responsable de la precipitación de la materia colorante y de la turbidez en los vinos. Este es el caso del fosfato férrico, sal blanquecina que origina la "quiebra blanca" al generarse hierro (III). Por otra parte, las combinaciones que tienen lugar del hierro (Fe(III)) con los polifenoles, de color azul oscuro, son la causa de la "quiebra azul". Los vinos blancos están más sujetos a la primera, y, por el contrario, los vinos tintos, ricos en taninos, a la segunda, dejando posos azulados en el vino.

Una concentración total de hierro de unos 10 mg /L indica riesgo de quiebras férricas, si bien, la cantidad máxima de hierro que tolerará un vino antes de que se produzca la quiebra depende del tipo de vino, composición y hasta cierto grado, de las condiciones de almacenamiento. Por encima de estos límites se alteran sus propiedades organolépticas. De ahí que el contenido de hierro en vinos sea considerado un parámetro de calidad del mismo.

3. ¿QUÉ ES LA VOLTAMPEROMETRÍA?

La voltamperometría incluye un grupo de técnicas electroquímicas en las que se aplica un determinado potencial eléctrico a un electrodo de trabajo sumergido en una disolución que contiene una especie electroactiva y se mide la intensidad de corriente que circula por dicho electrodo. La intensidad medida es función del potencial aplicado y de la concentración de la especie electroactiva presente. En estas técnicas, se estudian los cambios de corriente, como una función del potencial aplicado a través de la celda electrolítica. El registro se denomina voltamperograma. En los voltamperogramas hay una cierta cantidad de picos y por medio de la variación de las velocidades de barrido e intervalos de potencial podemos observar como estos aparecen y desaparecen, notando las diferencias que existen entre el primer y los barridos subsecuentes. Se determina cómo los procesos representados por los picos, los cuales están relacionados al mismo tiempo con la dependencia de la velocidad de

Determinación voltamperométrica de hierro en vinos

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

barrido y amplitud del pico. Esto explica el papel de la adsorción, difusión y reacciones químicas acopladas dentro del proceso en estudio.

El proceso involucra la electrólisis de una o más especies electroactivas (reducible u oxidable), el cual comprende la reacción de la especie electroactiva en el electrodo y el mecanismo de transferencia de masa. Al estar presente una especie electroactiva, se registrará una corriente cuando el potencial aplicado se vuelva suficientemente negativo o positivo para que esa especie se electrolice [por convención, una corriente catódica (reducción) es positiva y una corriente anódica (oxidación) es negativa]. Si la solución se encuentra diluida, la corriente alcanzará un valor límite porque el analito sólo se puede difundir hacia el electrodo y electrolizarse con una rapidez finita, dependiendo de su concentración [7].

Algunos iones metálicos, como el hierro, forman neblinas en el vino, que generan turbidez, aunque hoy en día, este parámetro es más difícil de encontrar [2].

4. DETERMINACIÓN DE HIERRO EN BEBIDAS

A lo largo de los años, se han realizado numerosos estudios para la determinación de hierro en diferentes bebidas. La concentración de metales en muchas bebidas alcohólicas puede ser un parámetro significativo que afecte a su consumo y conservación. Esto se deriva de los efectos negativos y positivos generados directa o indirectamente por la presencia de metales [8].

Una de las bebidas en las que se ha llevado a cabo la determinación de hierro ha sido en vinos de zarzamora. La primera investigación realizada por Amidžić Klarić et al (2011), utilizó espectrometría de absorción atómica de llama (F-AAS), espectrometría de emisión atómica de llama (F-AES), y espectrometría de absorción atómica de horno de grafito (GF-AAS). Pero debido a las altas cantidades de sustancias interferentes, se demostró que la determinación de metales por este procedimiento era manualmente exigente y costoso debido al consumo significativamente mayor de cubetas de grafito [9].

En el siguiente estudio, se llevó a cabo un método de ceniza en seco para hacer más eficaz la determinación de los metales en la matriz compleja de este vino.

Los resultados de este estudio demostraron claramente la aplicabilidad del análisis multivariado de datos F-AAS / F-AES y GF-AAS, después de secar las muestras, como una herramienta para la clasificación de vinos de zarzamoras basados en su composición mineral [10].

Determinación voltamperométrica de hierro en vinos

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

Con un método diferente a los realizados en los ensayos anteriores, se ha determinado la presencia de hierro en bebidas gaseosas y en bebidas alcohólicas. El ensayo se basó en el uso de espectrometría de masas con una fuente de plasma fría (ICP-MS). Esta técnica de análisis tiene una gran sensibilidad, velocidad y precisión, proporcionando bajos límites de detección que van desde ppb hasta ppt. Los resultados de este método, según F. Bianchi, M. Careri, et al, revelaron que este es eficaz para la determinación del hierro en bebidas gaseosas y alcohólicas [11].

La presencia de hierro en bebidas alcohólicas también fue estudiada mediante fluorescencia de rayos X de reflexión total (TXRF). Esta técnica es una espectrometría de rayos X derivada de la clásica técnica de fluorescencia de rayos X por dispersión de energía [12]. Es un método simple y rápido. En este ensayo se demostró que la TXRF es una técnica útil para la determinación de metales traza en licores destilados, que requiere pequeñas cantidades de muestra. Y la calidad analítica de los resultados es comparable a la técnica FAAS (T. Capote, et al., 1999) [13].

Otro método desarrollado y que fue probado en muestras de leche y agua, es un método espectrofotométrico de Nanodrop. Es un método rápido, simple y sensible. En el ensayo se demostró que no es necesario hacer un gasto excesivo en reactivos ya que solo se necesita una pequeña muestra de microlitros. La sensibilidad del método se mejora utilizando N-octilacetamida. El método es altamente sensible y se considera aplicable para la determinación rápida de hierro en muestras de agua a nivel de nanogramos [14].

5. DETERMINACIÓN DE HIERRO EN VINO

La cantidad de iones inorgánicos en el vino es de gran interés, debido a su influencia en la calidad del vino, así como sus efectos tóxicos (Gonzalez-Hernandez, de la Torre, & Arias Leon, 1996) [15]. Por lo tanto, la determinación de algunas especies metálicas críticas, como el hierro, es importante. La evaluación del contenido de Fe en los vinos es de gran importancia ya sea debido a los cambios en la estabilidad que puede causar ya sus efectos sobre la oxidación y el envejecimiento del vino.

En un estudio, se determinó el contenido total de hierro de varios vinos blancos, rosados y tintos utilizando dos espectroscopios UV-Visibles. En uno de ellos se utiliza

Determinación voltamperométrica de hierro en vinos

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

el método de tiocianato modificado y en el otro se usa utilizando el método Nitro-PAPS.

El resultado de la determinación de hierro mediante estas técnicas fue comparado con el método estándar AAS. Estos son rápidos, precisos, sencillos, relativamente baratos, se pueden utilizar para todo tipo de vino comercial (blanco, rosado y tinto), y lo más importante no requieren un equipo especial o personal altamente capacitado [16].

Mediante Fluorescencia de rayos X de reflexión total también se determinó el nivel de hierro presente en diferentes muestras de vino. Al igual que T. Capotea (2010) aplicó este método en bebidas espirituosas, los resultados obtenidos son correctos y por tanto se puede considerar una técnica adecuada para determinar el nivel de hierro en vino. [17] De forma similar Sofia Pessanha et al., hicieron un estudio de la presencia de metales pesados en diferentes etapas de la producción de vino. Este estudio permitió demostrar la idoneidad de la espectrometría TXRF en la determinación de elementos inorgánicos [18].

Otra manera de determinar la presencia de hierro y otros metales en vino es mediante los sistemas de extracción líquida / líquida de tiocianato / isobutilmetilcetona (MIBK) y fenantrolina / perclorato / MIBK o mediante extracción en columna de fase sólida de compuestos de Fe(III) asociados a especies de hierro orgánico con cloruro de trioctilmetilamonio (TOMACI), que actúa como reactivo de extracción [19].

Otro método, para el análisis de especiación del hierro inorgánico en el vino, se basa en las reacciones del hierro (II) con Br-PADAP en ausencia y también presencia de un agente reductor (ácido ascórbico) para la determinación de hierro (II) y hierro total. El método propuesto para la especiación inorgánica de hierro tiene precisión satisfactoria y puede aplicarse para la cuantificación de hierro en vinos blancos y tintos. Además, es muy simple en comparación con otros publicados, que requieren procedimientos de separación [20].

La espectrometría de absorción atómica de llama es una técnica que también se ha utilizado para medir el nivel de hierro y otros metales en vino. Los resultados indican que este método es ideal para la determinación de este metal en muestras de vino diluidas [21].

Un método novedoso para la detección de hierro y otros metales es una lengua electrónica basada en sensores químicos potenciométricos que detectan

Determinación voltamperométrica de hierro en vinos

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

cuantitativamente ciertos metales, después de que el vino se ha digerido o no. Estos sensores están hechos de vidrio de chalcogenuro y recubierto de membranas de PVC. Se pudo detectar el hierro, mediante sensores selectores de hierro discretos y curvas de calibración, producido en las disoluciones modelo [22].

Otra técnica poco utilizada para la determinación de metales es un biosensor desechable. Este biosensor se basa en un transistor de efecto de campo donde una red de carbono de una sola pared, “nanotubos”, actúa como el canal conductor, constituyendo transistores de efecto de campo de nanotubos de carbono. Se utilizó como inmunoreacción un anticuerpo como la transferrina con dos ligaduras específicas de hierro de alta afinidad. Las principales ventajas de este dispositivo desarrollado es su velocidad y comodidad (es un método económico). Además, no es necesaria la manipulación excesiva de las muestras, ya que no requieren un pretratamiento adicional. El límite de detección se encuentra por debajo de muchas otras técnicas y tiene una alta capacidad de respuesta a diferentes concentraciones de hierro [23].

Omer Sadak, AshokK.Sundramoorthy, et al., desarrollaron un método de colorimetría de alta selectividad y electroquímica de hierro (III), utilizando una película de grafeno funcionalizada en rojo Nilo. En el ensayo utilizaron el sensor para detectar Fe (III) en muestras de vino tinto. Se determinó la concentración de Fe (III) y se obtuvieron resultados que confirman que el sensor electroquímico es un sensor fiable para medir el contenido de Fe (III) en muestras de vino [24].

La determinación del contenido de hierro en los vinos se ha realizado con numerosos métodos, como colorimétricos, espectrofotométricos (Amerine & Ough, 1974, et al.) [25-30], AAS ((AOAC, 1998, et al.) [31], polarografía diferencial de impulso ((Vazquez Diaz, et al. 1994) [32], cromatografía de intercambio iónico-FAAS (Ajlec & Stupar, (1989) [33], HPLC con detección electroquímica y FAAS (Weber, 1991) [34], SIA-FAAS (de Campos Costa, et al. 2001) [35-36].

Pero este tipo de métodos analíticos requieren frecuentemente la preconcentración o pretratamiento de la muestra. Los métodos analíticos más comunes para determinar metales son la espectrometría de absorción atómica (AAS), la espectrometría de emisión atómica (AES) y la espectrometría de emisión óptica de plasma acoplada inductivamente (ICP) (Camean et al., 2001) [37]. Análisis de inyección de flujo (FIA) [38], quimioluminiscencia [39], espectrometría de masas (ICP-MS) [40].

Determinación voltamperométrica de hierro en vinos

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

La cromatografía iónica también se utiliza para el análisis de metales, por ejemplo en vodka (Obrezkov et al., 2000) [41].

Desafortunadamente, la mayoría de estos métodos implican instrumentación bastante costosa (con su mantenimiento) que impide su uso generalizado entre los productores de bebidas alcohólicas.

También existen métodos colorimétricos, pero estos son menos convenientes porque se basan en la derivatización del analito para producir un compuesto coloreado, lo que hace gastar mucho tiempo.

Por otro lado, los métodos electroquímicos han ganado terreno considerable en el análisis de bebidas alcohólicas debido a su simplicidad, bajos límites de detección, gran rango de concentración dinámica, buena selectividad, rapidez, tiempo de respuesta, miniaturización y bajo costo relativo. Sin embargo, estas características dependen del uso de mediadores capaces de reconocer selectivamente el analito en muestras complejas.

En este contexto, se han realizado varios estudios de detección electroquímica de hierro en solución acuosa, que utiliza un amplio espectro de electrodos modificados químicamente con diferentes compuestos orgánicos e inorgánicos [42-48].

6. DETERMINACIÓN DE HIERRO EN AGUA MEDIANTE MÉTODOS VOLTAMPEROMÉTRICOS

El hierro, al igual que en el vino, es uno de los elementos que se encuentra presente en el agua y que a su vez, pueden generar problemas en el abastecimiento de agua potable.

El hierro puede darle al agua sabor, olor y un color indeseable. Puede generar manchas rojizas en la ropa y en utensilios de cocina.

La abundancia de hierro y sus estados de oxidación variables en el medio ambiente exige una determinación y cuantificación exacta. Se han desarrollado muchos métodos analíticos para detectar y cuantificar el hierro. Estos incluyen análisis de inyección de flujo, cromatografía, quimioluminiscencia, espectrofotometría y espectrofluorescencia. Los métodos espectrofotométricos han sido ampliamente utilizados, sin embargo, éstos son relativamente costosos para su uso en la determinación de iones metálicos y pueden sufrir interferencias. Por esta razón, se han hecho numerosos estudios para la determinación de hierro mediante métodos electroquímicos.

Determinación voltamperométrica de hierro en vinos

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

Min Lu, Richard G. Compton desarrollaron un método voltamperométrico anódico y catódico de rotura de onda cuadrada para la determinación de trazas de hierro en muestras de agua mineral embotellada, mediante un electrodo de grafito pirolítico (EPPG) plano no modificado y un electrodo impreso de pantalla (SPE) baratos y desechables.

Los resultados que se obtuvieron con estos electrodos indican que es posible la detección sensible de Fe (III), pudiéndose detectar a niveles por debajo del límite del establecido en agua. Los electrodos no modificados ofrecen propiedades atractivas tales como un bajo límite de detección, asequibilidad y simplicidad; características que son muy valiosas en el trabajo electroanalítico. El bajo límite de detección en un EPPG permite la determinación de hierro en muestras de agua, mientras que el carácter barato y desechable de las SPEs conduce a la posibilidad de diseño de análisis voltamperométricos portátiles para la detección de hierro, siendo al mismo tiempo la base para una determinación de hierro sin ser necesario el uso de electrodos de mercurio [50].

Fei Lia, Dawei Panb, Mingyue Lin et al. han desarrollado un método que se basa en el uso de óxido de grafeno iónico de líquido reducido (IL-rGO), que actúa como soporte para la deposición electroquímica de las nanodendritas de oro (AuNDs), recubierto por un polímero plástico denominado "Nafion".

Los nanomateriales de oro tienen propiedades únicas, como facilitar la transferencia de electrones entre las especies y el electrodo. Los nanopartículas de oro son bidimensional, formando una capa en la superficie del electrodo.

Este electrodo modificado mostró muy buenos resultados de selectividad, reproducibilidad y estabilidad para la detección de actividades electroquímicas de iones de hierro presentes en agua de río y en agua de mar, con un límite de detección más bajo y un rango lineal más amplio. Estos resultados indican que el electrodo fabricado puede funcionar en la determinación de hierro y es una plataforma prometedora para el electroanálisis exacto del rastro del hierro [49].

De forma similar, Yun Zhua, Dawei Pana, Xueping Hua, et al., desarrollaron un sensor electroquímico basado en óxido de grafeno reducido (rGO) y nanopartículas de oro (AuNPs), modificado para la determinación de hierro en trazas en aguas costeras con ayuda del ligando complejo de hierro 2- (5-bromo-2-piridilazo) 5 - dietilaminofenol (5 - Br - PADAP). Este último, es un agente complejante que reaccionó con hierro en corto tiempo. Este electrodo modificado tiene varias ventajas, tales como una fabricación

sencilla, una excelente reproducibilidad, repetibilidad y selectividad. Razón por la que el electrodo fabricado es de gran interés para determinar el hierro [50].

Min Lu, Richard G. Compton, et al., propusieron un método basado en un electrodo que contenía grafito de película gruesa modificado con calomelano para determinar hierro (III) mediante voltamperometría de separación. Los resultados indicaron que es un procedimiento válido para la determinación de hierro total en agua potable y natural [51,53].

Un método voltamperométrico catalítico sensible a través de un electrodo de película de bismuto fue desarrollado por Bobrowski A, Nowak K, Zarebski J. El método se basa en la reducción catódica del complejo Fe (III) -trietanolamina (TEA) a Fe (II). Los resultados indicaron que la adición de KBrO_3 causa la oxidación rápida de Fe (II) y TEA, y por lo tanto se aumenta la señal analítica de Fe (III) cuando TEA se coloca en la solución alcalina. El funcionamiento del electrodo de bismuto (BiFE) en condiciones optimizadas produjo una respuesta voltamperométrica catalítica estable para la detección de hierro, con alta sensibilidad, buena precisión y un bajo límite de detección, sin ser necesario un procedimiento de preconcentración [52].

7. DETECCIÓN DE HIERRO EN CERVEZA MEDIANTE MÉTODOS VOLTAMPEROMÉTRICOS

La cerveza es una bebida consumida en todo el mundo, y contiene cierta cantidad de trazas de elementos y minerales. La cantidad de estos depende del origen de las materias primas, del método de elaboración y del proceso productivo. Uno de los elementos que contiene la cerveza al igual que el vino, es el hierro y este es considerado positivo para la salud, ya que es esencial para la vida y la salud [54]. El hierro actúa sobre algunas características de la cerveza, como el sabor, el desarrollo de las levaduras, la formación de espuma y la turbidez. Por esta razón, es importante analizar el nivel de hierro presente en la cerveza.

Está demostrado, que el hierro participa en algunas reacciones de radicales libres, como la catalización de metales y además son responsables del deterioro de la cerveza [55].

Para determinar el nivel de hierro, han sido desarrolladas a lo largo de los años varias técnicas y una de ellas es la voltamperometría anódica de decapado. Esta técnica

Determinación voltamperométrica de hierro en vinos

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

resulta ventajosa frente a otras como la espectroscopia de absorción atómica electrotrémica o el plasma acoplado inductivamente, ya que es posible medir concentraciones bajas de hierro, es versátil, rápida y no necesita mucho trabajo previo a la medición. Además, es una técnica que tiene elevada sensibilidad, consiguiendo unos niveles de detección de ppb. Con este método, únicamente hay que someter a la cerveza a un proceso de preconcentración. La del ASV se debe a la etapa preconcentración en la que los iones metálicos en la solución de muestra se reducen, a potencial negativo, y se concentran en un electrodo de mercurio.

Los resultados obtenidos en este ensayo, indican que en todas las cervezas analizadas se detectó presencia de hierro, pero el nivel de hierro variaba según el tipo de cerveza. Esto quiere decir, que la voltamperometría de adsorción es un método válido para medir el hierro en cerveza [56].

Otro método voltamperométrico para la determinación de metales pesados como el hierro en la cerveza es un método de voltamperometría inversa mediante la combinación de la descomposición de rayos UV con un flujo a través de células.

En este método, la determinación de metales pesados con voltamperometría de pulso diferencial de redisolución anódica se puede llevar a cabo, al igual que en el método anterior, después de la concentración de la cerveza.

Para evitar la descomposición de la cerveza, se realizó un contraste de fotólisis UV de flujo inverso antes de la determinación, en la que se obtuvieron resultados satisfactorios.

Los resultados obtenidos varían según el metal a analizar. Para el cobre y el cadmio los resultados fueron satisfactorios, ya que se podía diferenciar la curva de cada uno de ellos en el voltamperograma. Pero para otros metales el resultado no fue satisfactorio [57].

También se ha utilizado la voltamperometría de redisolución para determinar hierro, y otros metales como el cinc, cadmio o plomo entre otros, en la cerveza, malta de cerveza, mosto, lúpulo, levadura o coadyuvantes de filtración.

El problema de la voltamperometría es la presencia de materia orgánica en el producto a analizar, ya que bloquea el electrodo de trabajo, por lo que para eliminar la materia orgánica se mineraliza la muestra hasta que tiene un aspecto transparente e incoloro.

El resultado que se obtuvo de este análisis, fue exitoso para el hierro y también para el resto de metales analizados. Además, se observó que la mineralización de las muestras puede realizarse por microondas, ya que al realizar el análisis

voltamperométrico no se observa ninguna diferencia, por lo que el análisis es más rápido y sencillo [58].

8. DETECCIÓN DE METALES, DIFERENTES AL HIERRO, MEDIANTE VOLTAMPEROMETRÍA EN VINO

También se ha desarrollado un método para la determinación de otros metales como cobre, plomo, cadmio y zinc en vinos secos mediante voltamperometría con un electrodo de grafito modificado de película gruesa. En este método no se requiere la digestión ácida preliminar de la muestra u otros pretratamientos para la destrucción de sustancias orgánicas.

El uso de electrodos de grafito modificado con película gruesa (TFMGE) en el análisis electroquímico presentan una alternativa interesante para eliminar el mercurio y disminuir el efecto adverso de las sustancias orgánicas. Algunos investigadores [59-61] describieron el uso de estos electrodos en el monitoreo ambiental y el análisis de líquidos alimentarios y biológicos, señalando la posibilidad de utilizarlos para analizar muestras complejas tales como agua natural y zumos entre otros.

A partir de los datos del ensayo se puede decir que los vinos secos pueden ser analizados para determinar el contenido de iones de metales pesados por el método TFMGE omitiendo la operación del pretratamiento de la muestra. El uso de TFMGEs hizo que el análisis de vinos secos sea más simple y rápido reduciendo los riesgos para el operador y el medio ambiente [62].

Con estos resultados podríamos decir, que es un método que podría aplicarse a la detección de hierro en vino.

Otro método desarrollado por para determinar otros metales en vino es una voltamperometría utilizando un electrodo de amalgama dental para monitorear algunos metales de vinos y licores. En concreto, se determinaron zinc y plomo. Dicha investigación indicó que la voltamperometría utilizada de amalgama dental no tóxica como material de electrodo es adecuada para la determinación de cinc y plomo en vinos tintos y blancos. El método presentado es sensible y fácil de usar, y puede ser una alternativa interesante a muchas de las técnicas actuales para medir metales pesados en vinos y licores [63].

Stozhko, NY y Kolyadina, LI desarrollaron un método original, simple y rápido que consume poca mano de obra y elimina la contaminación de una muestra y la pérdida de analitos por la preparación electroquímica de muestras de vino. Un electrolizador

Determinación voltamperométrica de hierro en vinos

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

de un solo compartimento de cuatro electrodos permite realizar todas las etapas del análisis voltamperométrico (preparación de muestras electroquímicas, preconcentración y determinación de metales pesados) [64].

Otro método estudiado para analizar metales en vino es una técnica voltamperométrica de arrastre anódico con un microelectrodo de mercurio sin pretratamiento. Este método, es el que los investigadores actuales tratan de evitar, ya que el mercurio es tóxico y puede generar interferencias a la hora de obtener los resultados de la determinación. Pese a esto, la combinación de un microelectrodo de mercurio con voltamperometría de redisolución anódica diferencial de impulso proporciona una sensibilidad excelente y proporciona resultados confiables para la determinación de metales pesados en el vino. Las mediciones pueden realizarse directamente sobre la muestra sin ningún pretratamiento y además, puede obtenerse cierta información sobre la especiación mediante la determinación de las concentraciones totales de metales después de un pretratamiento menor (adición de ácido fuerte).

Por último, cabe señalar que el comportamiento de los microelectrodos de mercurio es similar a la de los electrodos de película de mercurio, en el sentido de que las interferencias intermetálicas siguen siendo altas, mientras que los efectos de la materia orgánica son menos importantes [65].

Para determinar platino y rodio en vino blanco y tinto se utilizó una técnica voltamperométrica diferencial de impulso y otra de adsorción por decapado. Las ventajas que se observaron con esta técnica fueron la alta sensibilidad, lo cual mejoró los límites de cuantificación para los dos elementos, ya que ambos se presentan en niveles bajos en las muestras; la simplicidad, la rapidez y el bajo coste [66].

Un electrodo de microdisco de carbón revestido con bismuto para la determinación de trazas de metales pesados mediante voltamperometría anódica de decapado, fue analizado para determinar el rendimiento en las mediciones. El estudio se realizó en vino, agua potable y en salsa de tomate analizando el nivel de iones de plomo, cadmio y cobre.

Los resultados de este ensayo indicaron que los electrodos de microdisco de carbono ofrecen un buen comportamiento para la determinación de plomo y cadmio. Por el contrario, la determinación de cobre es difícil debido a la superposición que tiene lugar entre el bismuto y los picos de decapado sobre el cobre. Pero el uso combinado de estos dos microelectrodos (microelectrodo de bismuto y de microdisco de carbono) de

desmoldeo "libres de mercurio", puede ser un procedimiento analítico óptimo para el monitoreo de plomo y cobre en muestras reales [67].

9. DETECCIÓN DE HIERRO EN VINO POR VOLTAMPEROMETRÍA

A la hora de analizar los ensayos realizados para detectar hierro en vino mediante técnicas voltamperométricas, se ha podido observar que es un tema que no ha sido muy estudiado.

El ensayo que se ha desarrollado en los últimos años es un método basado en el uso de un microelectrodo modificado con hexacianoferrato de óxido de rutenio para la determinación de Fe (III) en muestras de vino. Este presenta buenas características electrocatalíticas para procesos electrodiales. El uso de microelectrodos tiene algunas ventajas, como la posibilidad de llevar a cabo el experimento en muestras de bajo volumen y la miniaturización del aparato. Además, puesto que una de las dimensiones de un microelectrodo es menor que el espesor de la capa de difusión de Nernst, se consigue un transporte de masa eficaz a la superficie del electrodo, dando como resultado una respuesta en estado estacionario en un tiempo muy corto.

El rendimiento analítico del microelectrodo fue comparado con el de diferentes sensores. Teniendo en cuenta el límite de detección, el valor encontrado para el sensor no es tan bueno como otros métodos estudiados, pero tiene una ventaja importante ya que puede ser utilizado a 0,0 V.

Además, la velocidad de transferencia de electrones es rápida, lo que hace que la respuesta voltamperométrica esté bien definida y tenga la sensibilidad aumentada [67].

10. CONCLUSIONES

Después de realizar la revisión de los métodos voltamperométricos utilizados para detectar hierro en vino, se puede concluir que es una técnica que no se ha estudiado en profundidad. La técnica analítica que se ha desarrollado es una técnica basada en el uso de un microelectrodo modificado con hexacianoferrato de óxido de rutenio. Si es cierto, que al compararse este método con otros tipos de sensores, los resultados no son tan buenos, pero esta técnica tiene la ventaja de que permite el uso de pequeñas cantidades de volumen de muestra, dando una respuesta en breve espacio de tiempo, con alta sensibilidad de detección.

Para medir hierro en vino, el método que más se ha utilizado es la espectrometría en sus diferentes técnicas. En ellas se incluyen la espectrometría de ultravioleta visible, de fluorescencia de rayos X o de absorción atómica de llama. U otro método menos

utilizado como el de colorimetría de alta selectividad o una técnica novedosa como puede ser la lengua electrónica basada en sensores químicos potenciométricos. Todos estos métodos son valiosos para la evaluación del hierro en el vino, pero casi todos requieren la preconcentración de la muestra.

Por otro lado, se ha podido observar que las técnicas voltamperométricas se han utilizado para medir otros metales diferentes al hierro presentes en el vino, como el cobre, plomo, cadmio y zinc, y también la presencia de hierro en otras bebidas, como agua, cerveza u otras bebidas alcohólicas. Todas ellas con resultados satisfactorios, rápidos y de bajo coste. Esto significa que estas técnicas podrían aplicarse en el vino y convertirse en una herramienta analítica poderosa, pudiendo acelerar la determinación del nivel de hierro, para evitar defectos visuales como es la turbidez en los vinos.

11. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Clark A, Wilkes E.N and Scollary G. Chemistry of copper in white wine: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 21: 339-350 (2015).
- 2 Gayon R, Glories, Maujean and Dubourdieu, (2006). *Handbook of Enology: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments* (2ª ed).
- 3 Ugliano M. Oxygen contribution to wine aroma evolution during bottle aging: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 6125-6136 (2013).
- 4 Viviers M.Z, Smith M.E, Wilkes E and Smith P. Effects of five metals on the evolution of hydrogen sulfide, methanethiol and dimethyl sulfide during anaerobic storage of chardonnay and shiraz wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(50): 12385–12396 (2013).
- 5 Danilewicz, J.C. Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system: Central role of iron and copper. *American Journal of Enology and Viticulture* 58(1): 53–60 (2007).
- 6 Preece G, Fang H, Schmidtke L.M and Clark A. Sensorially important aldehyde production from amino acids in model wine systems: impact of ascorbic acid, erythorbic acid, glutathione and sulphur dioxide. *Food Chemistry* 141: 304-312 (2013).
- 7 Christian G.D, (2009). *Química analítica* (9ª ed). México D. F. Mc Graw Hill.
- 8 Ibanez J.G, Carreon-Alvarez A, Barcena-Soto M and Casillas N. Metals in alcoholic beverages: A review of sources, effects, concentrations, removal, speciation, and analysis. *Journal of Food Composition and Analysis* 21: 672– 683 (2008)
- 9 Amidžić Klarić D, Klarić I, Mornar A and Nigović B. Evaluation of volatile compound and food additive contents in blackberry wine. *Food Control*. 50:714–721 (2015).

- 10** Amidžić Klarić D, Klarić I, Velić D and Vedrina Dragojević I. Evaluation of mineral and heavy metal content in Croatian blackberry wines. *Czech J Food Sci.* 29: 260–267 (2011).
- 11** Bianchi F, Careri M, Maffini M, Mangia A and Mucchino C. Use of experimental design for optimisation of the cold plasma ICP-MS determination of lithium, aluminum and iron in soft drinks and alcoholic beverages. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17: 251–256 (2003).
- 12** Fernandez Ruiz. R. Fluorescencia de Rayos X por reflexión Total (TXRF): Una gran desconocida (2010). *An. Quim.* 106(1): 05-12 (2010).
- 13** Capotea T, Marc L.M, Alvarado J and Greaves E.D. Determination of copper, iron and zinc in spirituous beverages by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B* 54: 1463-1468 (1999).
- 14** Verma C, Tapadia K and Bala Soni A. Determination of iron (III) in food, biological and environmental samples. *Food Chemistry* 221: 1415–1420 (2017).
- 15** Gonzalez-Hernandez G, Hardisson de la Torre A, and Arias Leon JJ. Quantity of K, Ca, Na, Mg, Fe, Cu, Pb, Zn and ashes in DOC Tacoronte-Acentejo (Canary Islands, Spain) musts and wines. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung* 203: 517–521 (1996).
- 16** Kyriakos A. Riganakos, Panayiotis G and Veltsistas. Comparative spectrophotometric determination of the total iron content in various white and red Greek wines. *Food Chemistry* 82: 637–643 (2003).
- 17** Anjos M.J, Lopes R.T, de Jesus E.F.O, Moreira S, Barroso R.C and Castro C.R.F. Trace elements determination in red and white wines using total-reflection X-ray fluorescence. *Spectrochimica Acta Part B* 58: 2227–2232 (2003).
- 18** Pessanha S, Carvalho M.L, Becker M and von Bohlen A. Quantitative determination on heavy metals in different stages of wine production by Total Reflection X-ray Fluorescence and Energy Dispersive X-ray Fluorescence: Comparison on two vineyards. *Spectrochimica Acta Part B* 65: 504–507 (2010).
- 19** Tasev K, Karadjova L, Arpadjan S, Cvetkovic J and Stafilov T. Liquid/liquid extraction and column solid phase extraction procedures for iron species determination in wines. *Food Control* 17: 484–488 (2006).
- 20** Ferreira S L.C, Ferreira H.S, de Jesus R.M, Santos J.V.S, Brandao G.C and Souza A.S. Development of method for the speciation of inorganic iron in wine samples. *Analytica chimica acta* 602: 89–93 (2007).

Determinación voltamperométrica de hierro en vinos

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

- 21 Gadzhieva A. Iron, Copper and Zinc Determination in wine using Flame Atomic Absorption Spectroscopy. Applications Chemist, Thermo Fisher Scientific (2016)
- 22 Simões da Costa A.M, Delgadillo I and Rudnitskaya A. Detection of copper, lead, cadmium and iron in wine using electronic Tongue sensosystem. *Talanta* 129:63-71 (2014).
- 23 Cámara-Martos F, da Costa J, Justino C.L, Cardoso S, Duarte A.C and Rocha-Santos T. Disposable biosensor for detection of iron (III) in wines. *Talanta* 154: 80–84 (2016).
- 24 Sadak O, Sundramoorthy A and Gunasekaran S. Highly selective colorimetric and electrochemical sensing of iron(III) using Nile red functionalized graphene film. *Biosensors and Bioelectronics* 89: 430–436 (2017).
- 25 Amerine M.A., and Ough C.S. Wine and must analysis. New York: Wiley. (1974).
- 26 Garcia-Jahres C.M, Lage-Yusty M.A, and Simal-Lozano J. Second derivative visible spectroscopic determination of iron and manganese in Galician wines. *Journal of Analytical Chemistry*, 338: 703–706 (1990).
- 27 Lazaro F, Luque de Castro M.D, and Valcarel M. Intergrated retention/spectrophotometric detection in flow-injection analysis. Determination of iron in water and wine. *Analytica Chimica Acta*, 219: 231–238 (1989).
- 28 Meredith M.K, Baldwin S and Andreasen A.A. Determination of iron in alcoholic beverages. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, 53(1): 12–16 (1970).
- 29 Ribereau-Gayon J and Peynaud, E. (1962). Analisis de vinos. Madrid: Aguilar.
- 30 Salinas F, Galeano Diaz T, and Jimenez Sanchez J.C. Spectrophotometric determination of iron by extraction of the iron(II)-5,5-dimethyl-1,2,3-cyclohexetrione 1,2-dioxime 3-thiosemicarbazone complex. *Talanta*, 34(7): 655–656 (1987).
- 31 AOAC. (1998). Official methods of analysis, “Iron in distilled liquors” (16th ed.). Maryland: Gaithersburg.
- 32 Vazquez Diaz M.E, Jimenez Sanchez J.C, Callejon Mochon X and Guiraum Perez M. A. Differential-pulse polarographic determination of iron in acids, waters, fruit juices and wines. *Analyst*, 119: 1571–1574 (1994).
- 33 Ajlec R and Stupar J. Determination of iron species in wine by ion-exchange chromatography-flame atomic absorption spectrometry. *Analyst*, 114: 137–142 (1989)..
- 34 Weber, G. Speciation of iron using HPLC with electrochemical and flame-AAS detection. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 340: 161–165 (1991).

Determinación voltamperométrica de hierro en vinos

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

- 35** De Campos Costa R.C., Cardoso M.I and Nova Araujo A. Metals determination in wines by sequential injection analysis with flame atomic absorption spectrometry. *American Journal Enology and Viticulture*, 51: 131–136 (2000).
- 36** De Campos Costa R.C and Nova Araujo A. Determination of Fe(III) and total Fe in wines by sequential injection analysis and flame atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 438: 227–233 (2001).
- 37** Camean A.M, Moreno I, Lopez-Artiguez M, Repetto M and Gonzalez A.G. Differentiation of Spanish brandies according to their metal content. *Talanta* 54: 53–59 (2001).
- 38** Elrod V.A, Johnson K.S and Coale K.H. Determination of subnanomolar levels of iron(II) and total dissolved iron in seawater by flow injection analysis with chemiluminescence detection. *Anal. Chem.* 63(9): 893–898 (1991).
- 39** Bowie A.R, Achterberg E.P, Mantoura R.F.C and Worsfold P.J. Determination of sub-nanomolar levels of iron in seawater using flow injection with chemiluminescence detection. *Anal. Chim. Acta* 361: 189–200 (1998).
- 40** Grotti M, Soggia F, Ardini F and Frache R. Determination of sub-nanomolar levels of iron in sea-water using reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry after Mg(OH)₂ coprecipitation. *J. Anal. At. Spectrom.* 24: 522– 527 (2009).
- 41** Obrezkov O.N, Tolkacheva V.A, Zaikanova G.I, Yamnikov V.A, Krokhin O.V, Zhukov S.P and Shpigun O.A. The use of ion chromatography in vodka and liqueur production: Determination of transition metals. *Industrial Laboratory (Diagnostics of Materials) (Translation of Zavodskaya Laboratoriya, Diagnostika Materialov, Russia)* 66 (1): 18–21 (2000).
- 42** Motonaka J, Kageyama S, Mishima Y, Minagawa K, Masuda S and Ikeda S, *Anal.Chim. Acta* 369 87–92 (1998).
- 43** Alemu H and Chandravanshi B.S. Electrochemical behaviour of N-phenylcinnamohydroxamic acid incorporated into carbón paste electrode and absorbed metal ions. *Electroanalysis* 10: 116–120 (1998).
- 44** Yang S.X, Du L.H and Ye B.X, Cathodic Stripping Voltammetry Determination of Trace Iron with a Chemically Modified Electrode *Microchem. J.* 52: 216–222 (1995).
- 45** Compagnone D, Bannister J.V and Federici G, Electrochemical sensors for the determination of metal ions. *Sensors Actuat. B-Chem.* 7: 549–552 (1992).
- 46** Gao Z.Q, Li P.B and Zhao Z.F. *Talanta* 38: 1177–1184 (1991).
- 47** Zhiqiang G, Peibiao L, Guangqing W and Zaofan Z., *Anal. Chim. Acta* 241: 137–146 (1990).

Determinación voltamperométrica de hierro en vinos

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

- 48** Bai Z.P, Nakamura T and Izutsu K. Enhanced voltammetric waves of iron(III)—EDTA at a chitin-containing carbon paste electrode and its analytical application. *Electroanalysis* 2: 75–79 (1990).
- 49** Lia F, Panb D, Linb M, Hanb H, Hub X and Kang Q. Electrochemical determination of iron in coastal waters based on ionic liquid-reduced graphene oxide supported gold nanodendrites. *Electrochimica Acta* 176 548–554 (2015).
- 50** Zhua Y, Pana D, Hua X, Hana H, Lina M and Wanga C. An electrochemical sensor based on reduced graphene oxide/goldnanoparticles modified electrode for determination of iron in coastalwaters. *Sensors and Actuators B* 243:1–7 (2017)
- 51** Lu M and Compton R.G. Voltammetric determination of iron(iii) in water. *Electroanalysis*, 25 (5): 1123–1129 (2013).
- 52** Bobrowski, Nowak K and Zarebski J. Application of a bismuth film electrode to the voltammetric determination of trace iron using a Fe(III)-TEA-BrO₃⁻ catalytic system.
- 53** StozhkoO N.Y, Inzhevatoval V and Kolyadina I. Determination of Iron in natural and drinking waters by Stripping Voltammetry. *Journal of Analytical Chemistry* 60(7):668-672 (2005).
- 54** Locatelli C. Overlapping voltammetric peaks: an analytical procedure for simultaneous determination of tracemetals. Application to Food and environmental matrices. *Anal Bioanal Chem* 381:1073–1081 (2005).
- 55** Zufall C and Tyrel Th. The influence of heavy metal ions on beer flavour stability. *J Inst Brew* 114:134–142 (2008).
- 56** Sancho D, Blanco C.A, Caballero I and Pascual A. Free iron in pale, dark and alcohol-free commercial lager beers. *Wiley Online Library* (2011).
- 57** Gutenberg J. Invers-voltammetrische Bestimmung einiger Schwermetalle in Bier durch Kombination eines UV-Aufschlusses mit DurchfluBzelle. *Fresenius J Anal Chem* 335: 748 – 750 (1989).
- 58** Vico I. Aplicación de la técnica de voltamperometría de redisolución al análisis de trazas de metales pesados en mosto, cerveza y materias primas. *Cerveza y Malta XLIII*, 170:25–27 (2006).
- 59** Brainina Kh.Z, Malakhova N.A, and Stojko N.Yu. Stripping voltammetry in environmental and food analysis. *Fresenius J. Anal. Chem.* 368: 307 (2000).
- 60** Faller C, Henze G, Stojko N, Saraeva S and Brainina Kh. Modified solid electrodes for stripping voltammetric determination of tin. *Fresenius. J. Anal. Chem.* 358: 670-676 (1997).

Determinación voltamperométrica de hierro en vinos

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

- 61** Brainina Kh, Schafer H, Ivanova A and Khanina R. Determination of copper, lead and cadmium in whole blood by stripping voltammetry with the use of graphite electrodes. *Anal. Chim. Acta.* 330: 175-181 (1996).
- 62** Brainina Kh, Stozhko N.Yu, Belysheva G.M, Inzhevatova O.V, Kolyadina L.I, Cremisini C and Galletti M. Determination of heavy metals in wines by anodic stripping voltammetry with thick-film modified electrode. *Anal. Chim. Acta.* 514: 227–234 (2004).
- 63** Mikkelsen Ø, Schrøder K.H. Voltammetry using a dental amalgam electrode for heavy metal monitoring of wines and spirits. *Analytica Chimica Acta* 458: 249–256 (2002).
- 64** Stozhko NY and Kolyadina LI. Electrochemical sample preparation for the voltammetric determination of heavy-metal ions in wine. *Journal of analytical chemistry*, 60(10): 901-907 (2005).
- 65** Daniele S, Baldo M.A, Ugo P and Mazzocchin G. Determination of heavy metals in real samples by anodic stripping voltammetry with mercury microelectrodes Part 1. Application to Wine. *Analytica Chimica Acta*, 219: 9-18 (1989).
- 66** Amorello D, Barreca S, Gulli E and Orecchio S. Platinum and rhodium in wine samples by using voltammetric techniques. *Microchemical Journal* 130: 229–235 (2017).
- 67** Baldo M.A and Daniele S. Anodic Stripping Voltammetry at bismuth-coated and uncoated carbon microdisk electrodes: application to trace metals analysis in food samples. *Journal Analytical Letters Volume* 37: 995-1011 (2004).
- 68** Peña R.C, Ruas de Souza A.P and Bertotti M. Determination of Fe(III) in wine samples using a ruthenium oxide hexacyanoferrate modified microelectrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 731: 49–52 (2014).