



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

INFLUENCIA DE LOS GRUPOS DE ANTOCIANINAS Y TANINOS SOBRE LAS PROPIEDADES ORGANOLEPTICAS DE LOS VINOS TINTOS



DEPTO. DE QUIMICA
EXAMENES Y TITULACIONES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERO QUIMICO

PRESENTA:

HECTOR GUERRERO MONCADA

MEXICO, D. F.

1981



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

Página

Capítulo 1	Introducción	1
Capítulo 2	Generalidades	2
Capítulo 3	Métodos de análisis	44
Capítulo 4	Tablas	98
Capítulo 5	Fórmulas	109
Capítulo 6	Figuras	121
Capítulo 7	Conclusiones	128
Capítulo 8	Bibliografía	129

1.- INTRODUCCION

El presente trabajo tiene como objetivo poner de manifiesto la importancia del análisis químico en los vinos, así como la influencia de sus componentes en sus propiedades organolépticas como son, el color, el olor, - el sabor, la apariencia etc.

Las antocianinas y los taninos son los pigmentos principales en el vino tinto. Estos compuestos le dan su color y carácter organoléptico, de estas sustancias depende la diferencia entre los vinos tintos y los blancos. Los cambios químicos de las materias colorantes constituyen el proceso básico de añejamiento de los vinos tintos.

Los vinos de diferentes especies de uva se pueden diferenciar por su contenido de antocianinas.

2. GENERALIDADES

ANTOCIANINAS

Naturaleza de las presentes sustancias. Las antocianinas son pigmentos rojos y azules extensamente distribuidos en las plantas. Hasta 1952 los conocimientos de la composición química de las antocianinas estaban basados principalmente en el trabajo de Willstatter y Zollinger (9), Karrer y Widmer (10), y Robinson y Robinson (11). Estos estudios han hecho posible la aclaración de las estructuras químicas de las antocianinas, pero no se ha podido hacer un estudio riguroso de su distribución en las plantas porque los métodos son difíciles de aplicar y no lo suficientemente sensibles. Generalmente, hay muchas antocianinas del mismo género las cuales son difíciles de separar en cualquier parte de la planta.

Hay cinco antocianinas en la uva: delfinidina 1, petunidina 2, malvidina 3, cianidina 4, y peonidina 5. Estas agliconas existen en diferentes formas heterosídicas o como antocianinas: 3-monoglucósidos, 3,5-diglucósidos, 3,5-diglucósidos y heterósidos acetilados cuyas estructuras, en el caso de la malvidina se presentan por las fórmulas 6, 7 y 8. En las antocianinas aciladas, una molécula de ácido cinámico, mas generalmente ácido p-cumárico, se esterifica con el grupo -OH en la posición 6 de la molécula de glucosa (12).

El ácido acético es uno de los agentes acilantes de los 3-monoglucósidos de la V. cinerea (13).

La distribución de las antocianinas en las uvas es muy compleja; varía en el género Vitis como una -

función de las especies las cuales pueden contener de 6 a 17 miembros de esta familia de pigmentos. El método de ca racterización para los vinos híbridos los cuales contie nen diglu cosidos de antocianina, siempre ausentes en los vinos de la V. vinifera, está basado en estas diferencias de pigmentos entre las especies.

La única diferencia química conocida entre las variedades de uva comprende los pigmentos rojos: uvas con o sin antocianinas ó uvas con ó sin diglucosidos de antocianinas. Estas diferencias forman la base para los métodos de caracterización de los productos de la vid: los vinos blancos y los vinos tintos en un grupo y los vinos tintos de la V. vinifera y los vinos tintos de los híbridos en el otro. A pesar de que en el primer caso la dife rencia es evidente por si misma y en el segundo es neces ario realizar análisis químicos, las diferencias son en esencia idénticas.

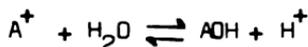
PROPIEDADES DE LAS ANTOCIANINAS

Varias propiedades químicas y fisicoquímicas de las antocianinas influyen en su estructura y consecuentemente en su coloración; que son tan importantes en la interpretación del color del vino tinto.

Bajo condiciones débilmente ácidas el oxonio rojo, forma 9 está en equilibrio reversible con una pseudo-base 10; la posición del equilibrio depende del pH. En un ensayo en un medio sintético una solución de antocianinas tiene una coloración seis veces más intensa a pH de 2.9 que a pH de 3.9.

La importancia de esta reacción en el color de las antocianinas se muestra en la tabla I. Cuando el pH aumenta, la absorción en la región ultravioleta ($\lambda = 278$ nm) de los compuestos aromáticos no se ve afectada; por otra parte, la absorción causada por el heterociclo central ($\lambda = 510$ nm) varía grandemente.

Simbolice A^+ como la forma oxonio y AOH su pseudo-base, el equilibrio será:



Con $[H_2O] = 1$, en equilibrio se tiene: $K = \frac{[AOH][H^+]}{[A^+]}$

lo cual es $\log \frac{[AOH]}{[A^+]} = pH - pK$

Experimentalmente, Sondheimer (14) y Berg (15) encontraron que los valores de pK para el pelargonidín-3-monoglucósido y para el maldivín-3-monoglucósido se acercan a 3 lo cual es un valor cercano al pH del vino. A este pH alrededor del 50% de las moléculas de antocianina están en la forma roja y 50% en la forma incolora.

Los iones bisulfitos HSO_3^- , condensan con las antocianinas. Esta reacción reversible disminuye el color formando un compuesto incoloro (12) (16). Este efecto es menos evidente en medio fuertemente ácido, por la concentración de los iones bisulfitos ya que se encuentran como ácido sulfuroso no disociados. Este mecanismo explica la decoloración de los vinos tintos siguiendo el tratamiento de sulfito, pero que es reversible, el color reaparece gradualmente conforme el SO_2 libre (iones bisulfitos) disminuye. El mayor papel de los taninos en el color de los vinos añejos se explica, su insensibilidad al cambio de color con SO_2 .

Las antocianinas son también decoloradas por reducción, y de nuevo la reacción es reversible. El mecanismo para esta reacción no ha sido explicado, pero se puede suponer que ocurre a través de una estructura de flaveno (14) análogo a la reacción clásica para la reducción de las moléculas biológicas. Esta reacción puede explicar el ligero color de algunos vinos nuevos, de los tanques de fermentación, donde ocurre fuertemente este proceso de reducción. El color debe tomarse más oscuro con la oxidación progresiva de las antocianinas y probablemente de los taninos, una reacción es más rápida en barriles de madera de 225 litros que en tanques con aires cerrados.

Las antocianinas (petunidina, delfinidina, cianidina) que presentan dos grupos OH en la posición orto - del anillo lateral (lado) se acomplejan con los metales - pesados (hierro férrico y aluminio) formando compuestos - azules con estructuras intrincadas. Estas reacciones ocurren mas lentas en medio ácido. Esta propiedad se aplica a las flores rojas y azules. Este complejo de fierro se presenta en los vinos muy delicados, que consiste en la formación de los complejos insolubles de fierro con los compuestos colorantes y taninos. Sin embargo hay pocos indicios precisos en la influencia exacta de estos complejos en el color verdadero de los vinos tintos, probablemente no interfieran mucho.

Sin embargo, la adición de fierro a los vinos nuevos, ricos en antocianinas aumenta su color debido a la formación de un complejo inestable de fierro. Esto debe ocurrir al mismo tiempo que la reoxidación de los pigmentos que fueron reducidos durante la fermentación para explicar el aumento de color en algunos vinos en las semanas posteriores de la vinificación. Los mecanismos pobremente comprendidos coinciden con la destrucción de las moléculas de antocianina, que ocurre durante el almacenamiento del vino (15, 17). Estos fenómenos probablemente de oxidación; son catalizados por los iones de Fe^{3+} y ocurren con incremento de la velocidad al aumento de temperatura, que puede contar para la destrucción enzimática de las antocianinas por las antocianinasas. Estas enzimas no parecen existir en las uvas, pero son segregadas en abundancia por la *Botrytis cinerea* (el hongo gris que es producido durante la putrefacción de las uvas), la cual es la causante de la formación de complejos inestables de fierro que hacen que cambie de color el vino.

DISTRIBUCION DE LAS ANTOCIANINAS EN LAS DIFERENTES ESPECIES DE LA VITIS.

La cromatografía se adapta bien para separar e identificar las antocianinas en las uvas (1, 18). Los peltos se obtienen exprimiendo las uvas individualmente entre el dedo pulgar y el índice, la extracción se hace por maceración en HCl al 1%. La solución resultante es tan rica en pigmentos que puede someterse a cromatografía sin necesidad de una concentración preliminar.

La cromatografía en dos dimensiones se lleva a cabo (1) usando el sistema de disolventes en dos fases recién preparados de alcohol butílico-ácido acético-agua (4:1:5). La fase acuosa inferior es el solvente 1, y la fase superior es el disolvente 2. Al usar este método, los dos pigmentos encontrados en las diferentes uvas estudiadas se separan en los cromatogramas como se muestra en la figura 1; la tabla II da la identidad de cada sustancia. Los pigmentos representados por 18A, y 20 y 20A no han sido identificados químicamente.

Los datos en la tabla II, se obtuvieron observando el color de las manchas, su fluorescencia bajo luz ultra violeta y la relación entre la estructura química y la posición del pigmento en el cromatograma, cada compuesto identificado tuvo que ser aislado; esto se hizo por una serie de separaciones cromatográficas usando muchas hojas de papel pesado. Así para cada antocianina, la caracterización química de la aglicona, el azúcar y eventualmente el residuo acilado pudieron ser llevados a cabo. Todos estos puntos así como las técnicas para determinar las proporciones de los pigmentos individuales, se -

desarrollaron en detalle (1). Las ventajas de estos métodos, especialmente aquellos de la carta cromatográfica en la figura 1, han sido bastante discutidos por Ingalsbe - (19) en su estudio de las antocianinas en la variedad Concord.

Los resultados de las antocianinas en las 14 especies de la Vitis están puestos en la tabla III; la tabla VI muestra el lugar de cada especie dentro del género.

Los datos en la tabla III muestran lo siguiente:

Primero: malvidin-3 monoglucósido (oenina) que es el principal constituyente de la materia colorante de la uva en la V. vinifera, pero no representa la mayoría del pigmento, ya que comprende solamente el 36% (aun menos en Muscat Hamburg) del pigmento total.

Segundo: no hay predominio de los derivados monometilados como se informa para las especies americanas.

Tercero: nunca se han encontrado antocianinas en la materia colorante de las uvas.

Cuarto: los diglucósidos de antocianinas están frecuentemente en las especies americanas, pero no completamente en la V. vinifera. Anteriormente este efecto, sólo había sido informado por Brown (20) para la V. rotundifolia. Esta observación es muy importante porque la determinación de estos diglucósidos, hace posible la dife -

renciación entre las uvas y las parras de la *V. vinifera* y los híbridos. Esto ha sido confirmado por muchos investigadores.

Quinto: la presencia de la cianidina y los derivados de la peonidina (obs OH en el anillo lateral) entre las antocianinas de las uvas es común; se encuentran en todas las especies sistemáticamente a pesar de que abundan solamente en muy pocas. Esto explica por qué este efecto no fué notado por mucho tiempo. Se observa que con excepción de la Muscat Hambourg, las dos especies que mejor muestran esto son la *V. lincecumii* y la *V. aestivalis*, las cuales de acuerdo a los especialistas en ampelografía, están al menos muy relacionadas, si no son idénticas.

Sexto: La ausencia de las antocianinas aciladas se demuestra en (18, 21) y esta característica es específica para estas variedades de *V. vinifera*.

Se han publicado muchos trabajos sobre la comparación de las especies y sobre la presencia de los diglucósidos en la *V. vinifera* han sido informados en publicaciones previas (1, 2, 22). Algunas de estas publicaciones informan de la presencia de los diglucósidos en la *V. vinifera*, pero se ha probado que sus conclusiones son falsas, no hay diglucósidos en la *V. vinifera*. Los métodos cromatográficos han permitido la reclasificación de algunas variedades pertenecientes en las especies *V. vinifera*. Notablemente, en la universidad de California, Davis, Bockian y colaboradores (23) informaron malvidin-3,5-diglucósido en Cabernet Sauvignon, pero esto no ha sido confirmado en un trabajo más extenso del mismo grupo (18).

En la Unión Soviética, Dourmichidzé y Noutsoubisé (24) y Dourmichidzé y Sopromadzé han identificado estos diglucósidos en alguna V. vinífera; no se ha confirmado este resultado en las mismas parras cultivadas en Francia, ni en las uvas enviadas por S. V. Dourmichidzé, excepto para Asuretuli Shavi.

Se creía que esta variedad era una vinífera, - pero ahora parece pertenecer a otras especies. La misma conclusión se aplica a los resultados más recientes de Cappelletti (26) y Getov y Petkov quienes sugieren la presencia de los diglucósidos en la V. vinífera. Se ha discutido la presencia de trazas de malvidin-3,5- diglucósido en la V. vinífera, su identificación, se hace más a menudo - en los vinos, que en las uvas. En efecto, la mayoría de los trabajos en este campo, han tratado más con la diferenciación de los vinos de la vinífera y de los híbridos, por análisis de sus materiales colorantes, que con la fisiología del vino. Los resultados se obtienen aplicando métodos muy sensibles, los cuales exigen concentración de los compuestos colorantes, pero se puede mostrar al producir artefactos que llevan una mancha débil que nunca haya sido identificada a lo largo de los cromatogramas y localizada en el mismo lugar que los diglucósidos de antocianina.

Para finalizar ello implica, que la misma vid puede o no, dependiendo de las condiciones, producir diglucósidos de antocianinas. Esto será, lo mismo que, decir que la misma vid pudiera producir uvas blancas o uvas negras. Aun cuando esto fuera verdad ; se podría obtener vino blanco de una vid que produjo uvas negras de manera

continua?. La presencia de los diglucósidos hace pensar - como una constante fisiológica de la variedad. Por tanto, todas las plantas deben ser idénticas. Las mutaciones ocurrren, pero son definitivas, y también conducen a nuevas - variedades.

TANINOS

Definición. Persiste algo de confusión en la definición de tanino; que incluye bajo este nombre muchas sustancias de estructura variante, pero que tienen la habilidad común de transformar las pieles frescas en cueros a prueba de podredumbre y escasamente permeables. Su carácter fenólico de estas sustancias ha causado a menudo confusión entre los taninos y los compuestos fenólicos de las plantas.

Los taninos son compuestos fenólicos especiales caracterizados, por su habilidad para combinarse con las proteínas y otros polímeros tales como los polisacáridos. Esta característica explica sus propiedades de curtido, como que surgen de una matriz tanino-colágeno y luego su astringencia causada por la precipitación de las proteínas y glicoproteínas de la saliva. Los taninos también se usan para afinar los vinos, porque se combinan con las proteínas. Finalmente, inhiben las enzimas por combinación con su fracción de proteína.

Para mantener los complejos estables con las proteínas, las moléculas fenólicas deben ser relativamente grandes, tal que puedan formar bastantes ligaduras con las moléculas de proteína, sin embargo, si la molécula de tanino es bastante grande, será incapáz de unirse con los centros activos en la proteína, y el enlace será menos probable.

Finalmente, los complejos tanino-proteína son más estables, y las calidades de tanino son muy altas cuando el peso molecular de los taninos oscila entre 500 y 3000. Así se llega a una definición válida para la que

mica industrial, en lo que comprende a sus propiedades características, sin referencia a la industria de la piel. Tal definición ha sido dada por Swain y Bate-Smith (28).

Parecería más práctico definir como taninos a todas las sustancias que se encuentran naturalmente, las cuales tienen propiedades químicas y físicas afines a aquellas que son capaces de hacer cuero. Esto significa que serían compuestos fenólicos solubles en agua, que tienen pesos moleculares entre 500 y 3000, y, que además dan las reacciones fenólicas usuales, que tienen propiedades especiales tales como la habilidad para precipitar los alóidos, las gelatinas y otras proteínas.

Es obvio, que tal definición incluirá moléculas las cuales no son taninos en el sentido comercial de ser económicamente importantes en el curtido de pieles, pero excluirá un gran número de sustancias cuya única relación con los taninos es su capacidad para reducir al permanganato alcalino o dar colores con las sales férricas.

Esta definición, demuestra bien que para identificar a los taninos en una muestra de planta, no es suficiente conocer su cantidad. Sus estructuras y particularmente sus pesos moleculares deben ser conocidos también.

Desde un punto de vista químico, los taninos se forman por la polimerización de moléculas fenólicas elementales; de acuerdo a la naturaleza de estas moléculas, se pueden distinguir los taninos hidrolizables (gállicos) y los taninos condensados (catequinas).

TANINOS HIDROLIZABLES.

Los taninos hidrolizables están compuestos de una molécula glucosídica a la cual están ligadas diferentes partes fenólicas; las más importantes de estas son el ácido gálico (15) y la lactona de su dímero, el ácido elágico (16). Estos no son los taninos naturales de las uvas, pero son los principales taninos comerciales (ácido tánico) autorizados por la legislación vigente, para agregarse a los vinos. Los taninos de roble también pertenecen a esta familia y puede agregarse a los vinos almacenados en barriles de madera. La presencia del ácido elágico en el vino, que aparece en la literatura necesita ser confirmada.

TANINOS CONDENSADOS.

Los taninos que se encuentran en las uvas y los vinos son polímeros condensados de los 3-flavanoles (catequinas) (17,18,19) y de los 3,4-flavandioles (leucoantocianidinas) (20, 21, 22).

Las leucoantocianidinas monoméricas, como sus formas polimerizables muestran la característica, de la que se diferencian de las catequinas por transformación en antocianidinas rojas, cuando se calientan en medio ácido. Por ejemplo, la leucocianidina (23) bajo estas condiciones produce cianidina (24).

Esta reacción no es total, se convierte alrededor del 20% de las moléculas elementales. Las otras llevan a cabo una condensación rápida, la cual conduce a -

los flavofenoles, productos insolubles café-negro. Bajo estas mismas condiciones de calentamiento las catequinas se convierten totalmente en flavofenoles.

Las plantas contienen leucoantocianinas las cuales se convierten en antocianinas por calentamiento con ácido. Estas antocianinas se informan en las uvas a principios de 1910 por Laborde (Estación de Enología en Burdeos). Sin embargo, solamente en los pasados 15 años ha sido cierto que esta conversión a antocianinas no es desde el punto de vista biológico, la propiedad más importante de estas sustancias y no deben considerarse como derivados de las antocianinas. Aun a pesar de que son conocidos hoy como los componentes principales de los taninos, la leucoantocianina no debe reemplazar la palabra tanino, la cual es de uso aceptado y representa los compuestos de propiedades bien definidas.

La polimerización de las moléculas de flavano es así, la semejanza esencial en la estructura del tanino, la cual gobierna sus propiedades, especialmente sus diferentes propiedades en los vinos. Durante la preservación y añejamiento, los cambios en el estado de condensación afecta el color de los taninos en la solución y sus características organolépticas. El estado de condensación se puede apreciar al examinar los pesos moleculares promedio de los taninos (de 500 a 700 para los vinos nuevos y de 2000 a 3000 para los vinos añejos). Los mecanismos químicos responsables, de esta polimerización deben ser entonces considerados en la interpretación del color del vino tinto.

Entre las hipótesis formuladas, el mecanismo más probable requiere formación de un enlace covalente entre el carbón 4 del 3,4-flavandiol (leucoantocianidina)

y los carbonos 6 u 8 de la otra molécula de flavano. El alcohol bencílico es un reactivo electrofílico (pérdida de OH^-) que los dona rápidamente en medio ácido; la leucoantocianina (25) funciona de manera similar en la posición 4. El grupo fenólico es una estructura mesomérica la cual desplaza los centros nucleofílicos cargados negativamente, en las posiciones orto y para, los centros análogos pueden encontrarse en las posiciones 6 y 8 de las moléculas de flavano. Esto permite la posibilidad de un enlace covalente entre el carbón 4 de 25, y los carbonos 6 u 8 de 26a o 26b. Este enlace se atribuye a la eliminación de molécula de agua.

Basado en estos principios Jurd (29) describió las reacciones más probables (fig.2). Una molécula de leucoantocianidina 25 reacciona con una molécula de flavano 26a o 26b, produciendo dímeros 27a, 27b, 28a o 28b. Si la molécula de flavano es también una leucoantocianidina ($\text{R}=\text{OH}$), el dímero contiene un nuevo alcohol bencílico (OH) y puede continuar la condensación. Si esta segunda molécula es una catequina ($\text{R}=\text{H}$), la condensación no puede ir mas allá que el dímero, la cual es una proantocianina. Las proantocianinas en los tejidos de la planta se conocen desde hace tiempo.

Las estructuras 29 y 30 son tales dímeros (31). Además, Bathia y colaboradores (32) han identificado una proantocianina 32. Compuesta de tres moléculas de leucoantocianidina 32, en las semillas de las uvas blancas.

Finalmente, Weinges y colaboradores (31, 33) postularon la formación de dímeros tales como 27 o 28, 29 o 30 directamente de las catequinas sin involucrar los 3,4-flavandioles (leucoantocianidinas). Este proceso nun-

ca ha sido demostrado en las frutas directamente, específicamente en las uvas.

Solamente los dímeros de la proantocianina han sido identificados positivamente, a través de la formación de las catequinas y las antocianidinas durante la hidrólisis en medio ácido. La formación de dímero procede de la oxidación enzimática de dos moléculas de catequina (26b); el mecanismo de reacción descrito en la figura 2 no interviene. Por calentamiento, los dímeros y los polímeros más grandes, forman antocianinas en medio ácido; los 3,4-flavandioles formados bajo estas condiciones no deben interferir con la formación de los taninos. Sin embargo, la teoría de Weinges se basa en el efecto de que los 3,4-flavandioles, capaces de encontrarse como dímeros, nunca han sido encontrados en la naturaleza en forma monomérica. Este argumento tal vez no sea suficiente; cuando estos compuestos fueron sintetizados en el laboratorio (34), fueron completamente inestables y muy propensos a condensar, y esto puede ser lo que pasa en la planta.

Otra posibilidad para la condensación de las moléculas de flavano, requerida para los procesos oxidantes, la enfrentan Hathway y Seekins (35). Ellos han demostrado que la oxidación de catequina por oxígeno en el aire o por la polifenoloxidasas conduce a un polímero de estructura quinoidal, con una estructura quinoidal entre el carbono 6 u 8 de la otra posible (33). Estos polímeros son de color amarillo-café, el cual se profundiza conforme aumenta la condensación. Aún si esta reacción naturalmente no ocurre en las uvas su presencia durante el almacenaje del vino parece posible, también se pudo explicar el que los vinos se vuelvan cafés (los vinos blancos).

ca ha sido demostrado en las frutas directamente, específicamente en las uvas.

Solamente los dímeros de la proantocianina han sido identificados positivamente, a través de la formación de las catequinas y las antocianidinas durante la hidrólisis en medio ácido. La formación de dímero procede de la oxidación enzimática de dos moléculas de catequina (26b); el mecanismo de reacción descrito en la figura 2 no interviene. Por calentamiento, los dímeros y los polímeros más grandes, forman antocianinas en medio ácido; los 3,4-flavandioles formados bajo estas condiciones no deben interferir con la formación de los taninos. Sin embargo, la teoría de Weinges se basa en el efecto de que los 3,4-flavandioles, capaces de encontrarse como dímeros, nunca han sido encontrados en la naturaleza en forma monomérica. Este argumento tal vez no sea suficiente; cuando estos compuestos fueron sintetizados en el laboratorio (34), fueron completamente inestables y muy propensos a condensar, y esto puede ser lo que pasa en la planta.

Otra posibilidad para la condensación de las moléculas de flavano, requerida para los procesos oxidantes, la enfrentan Hathway y Seekins (35). Ellos han demostrado que la oxidación de catequina por oxígeno en el aire o por la polifenoloxidadasa conduce a un polímero de estructura quinoidal, con una estructura quinoidal entre el carbono 6 u 8 de la otra posible (33). Estos polímeros son de color amarillo-café, el cual se profundiza conforme aumenta la condensación. Aún si esta reacción naturalmente no ocurre en las uvas su presencia durante el almacenaje del vino parece posible, también se pudo explicar el que los vinos se vuelvan cafés (los vinos blancos).

Esta reacción oxidante debe explicar la función catalítica del hierro (Fe^{3+}) en los cambios descritos de los taninos en el vino.

En conclusión, las propiedades características de los taninos (especialmente sus propiedades enológicas) están relacionadas a su habilidad para ligar las proteínas, una cantidad directamente relacionada a la polimerización de las moléculas de tanino, las cuales surgen de dos a 10 moléculas simples de flavano con los pesos moleculares alrededor de 20. Estos polímeros se conocen como flavolanos, como el tetrámero en 34.

El término proantocianidina se usa para los dímeros y posiblemente los trímeros.

El tanino en muestras de planta, uvas o vino - por ejemplo, es una mezcla de flavolanos de estructuras - variantes, los cuales determinan las propiedades del tanino. En consecuencia, para ser positivo acerca del tanino en una muestra, se deben hacer dos pruebas:

(a) el tanino total; y (b) cantidad de polimerización o proporciones de los diferentes flavolanos.

Esta segunda prueba es especialmente difícil de hacer y no ha sido perfeccionada. Esta dificultad es inherente en las características propias de los taninos - y en su habilidad para ligarse a las proteínas y otras macromoléculas (celulosa, poliamida), usados como soporte - cromatográfico. Esto explica por qué realmente no se ha informado verdaderamente el fraccionamiento efectivo de los flavanos. Es igualmente posible que los flavanos se asocien con cada uno, como una función de las condiciones

medias y que todas las manipulaciones necesarias durante la extracción permitan algunos cambios estructurales.

CLASIFICACION DE LOS VINOS POR SUS ANTOCIANINAS.

Principio. Se ha desarrollado un método práctico, para diferenciar los vinos tintos de la *V. vinifera* de los híbridos. Este método ha tenido profundos efectos, no solamente en el análisis del vino sino también en la regulación de operaciones comerciales. Antes de que se perfeccionará este método las plantaciones de parras híbridas iban aumentando, haciéndose mas difícil detectar objetivamente los vinos hechos de híbridos de las mezclas. La adulteración, que disminuye la calidad del vino y aumenta el volumen ha desaparecido completamente. Los métodos que se utilizaban antiguamente para detectar este fraude eran difíciles si no imposibles de aplicar. El nuevo método depende de las siguientes observaciones (1): 1° Las antocianinas nunca se encuentran en forma de diglucósido en las uvas de *V. vinifera*, 2° Los diglucósidos de antocianina en las uvas son una propiedad de la *V. riparia* y la *V. rupestris*.

En resumen la cualidad de los diglucósidos es genéticamente dominante.

La *V. riparia* y la *V. rupestris* son las dos especies mas usadas en hibridación; la mayoría de los híbridos usados comercialmente contienen diglucósidos en su materia colorante, pero la cualidad de los diglucósidos en la *V. vinifera* es recesiva; puede aparecer después de muchas cruza. Así una cruza entre la *V. riparia* y la *V. vinifera* produce una población F_1 de híbridos, conteniendo todos el carácter de los diglucósidos, pero si uno de estos híbridos F_1 se cruza con *V. vinifera*, la mitad de los híbridos F_2 no tendrá el carácter de los diglucósidos. La fruta de estos últimos viñedos tendrá la misma materia co

lorante que la *V. vinifera* (1).

Hay, por lo tanto, un límite inherente en este método.

La mayoría de los híbridos productores contienen diglucósidos de antocianina en su materia colorante, pero unos pocos son de lo mismo que la *V. vinifera*. El método de diferenciación, consiste entonces de la identificación de los diglucósidos de antocianina su presencia - prueba el origen híbrido de una uva de vino, pero su ausencia no es una prueba de que una uva o vino no es de *V. vinifera*.

TRANSMISION DEL CARACTER DE LOS DIGLUCOSIDOS.

Se ha demostrado que el carácter de los diglucósidos de la *V. riparia* y la *V. rupestris* es dominante - sobre la *V. vinifera*. Cualquier cruce entre la *V. riparia* (o *V. rupestris*) y la *V. vinifera* produce híbridos F_1 , - conteniendo todos diglucósidos en los materiales colorantes de sus uvas. Sin embargo, si un heterocigoto F_1 es de si mismo, debería mostrar la disyunción de carácteres y - la reaparición de los carácteres recesivos de la *V. vinifera*. En otras palabras, tal cruce daría aparición a una segunda generación, F_2 , en la cual algunos individuos no producirían diglucósidos en sus uvas como *V. vinifera*. La posibilidad teórica para la disyunción del carácter en un heterocigoto se demostró para los diglucósidos de antocianina de las uvas (2).

MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ANTOCIANINAS Y TANINOS.

El método descrito originalmente requiere de una forma simplificada de cromatografía en papel para detectar los diglucósidos de la antocianina. Este método se para los monoglucósidos y diglucósidos, sin separar las sustancias diferentes en cada familia. Se han sugerido numerosas variaciones, las cuales, todas usan alguna modificación de cromatografía en papel; no hay métodos originales. El método de Dorier y Verelle (34) usa los mismos principios de diferenciación, pero la evidencia de los glucósidos no depende más de la cromatografía, sino de la formación específica comenzando con malvidin-3,5-diglucósido, a través de la acción del nitrito de sodio, sobre el compuesto fluorescente verde en medio amoniacal.

Se pone una muestra de los vinos que van a ser estudiados en un papel de cromatografía a 6 cm de la punta inferior, en barras de 2 cm de largo y 2 cm aparte.

Es necesario hacer 10 aplicaciones, dejando que la mancha se seque entre las aplicaciones. El papel se mantiene vertical por medios apropiados con su orilla inferior en el disolvente el cual es una solución de un ácido débil no volátil (ácido cítrico a 6 g/l). El papel también puede colocarse, como una V invertida con sus dos puntas sumergidas en el disolvente (fig. 3), haciendo posible colocar muestras de los vinos en ambos lados del papel. El recipiente debe tener una cubierta para prevenir la evaporación excesiva. Las dimensiones del papel dependen del equipo usado (18 x 44 cm por ejemplo).

El disolvente alcanza la longitud del papel - por capilaridad, llevando los diglucósidos más rápido que los monoglucósidos. Así se obtienen las separaciones de - seadas. El método resulta en dos sepraciones (fig. 4).

Primero, la ausencia de diglucósidos la cual - corresponde al cromatógrama 1 (V. vinifera).

Segundo, la presencia de los diglucósidos la - cual corresponde al cromatógrama 2 (la mayoría de los híbridos). La presencia de los diglucósidos se confirma examinando el cromatógrama bajo luz ultravioleta donde el - malvidin-3,5-diglucósido (malvósido o malvina) fluoresce - con un brillo rojo "ladrillo". Esta propiedad es muy sensible a esta prueba.

El uso de este método se extendió rápidamente - principalmente para el control de calidad de los vinos de la French Apellations Controlées, la cual no debe conte - ner ningún vino híbrido. También Alemania legisló, para - la producción y venta de los vinos de híbridos; todos los vinos que se exportan en Francia se deben analizar prime - ro por cromatografía. En resumen, el informe sobre el tra - bajo de la tercera reunión (abril 10-12, de 1961) y de la cuarta reunión (mayo 7-9, de 1962) del Sub-Committee on - Analytical Techniques of the international Office of Vine and Wine muestra el interés excepcional en este método en los círculos enológicos. Este método ha sido adoptado ofi - cialmente por la legislación francesa.

Esta incluido en los métodos oficiales de análi - sis de vino publicado en el Journal Officiel del 20 de - septiembre de 1963 (orden oficial del 24 de junio de 1963) y se usa comunmente en todos los laboratorios.

ANALISIS DE LAS ANTOCIANINAS Y TANINOS, DETERMINACION DEL COLOR DEL VINO

Medición de las antocianinas.- El análisis -
cuantitativo de la concentración por colorimetría direc-
ta en el intervalo visible, no es práctico con los vinos -
tintos debido a las sustancias (taninos en particular) -
las cuales absorben al máximo para antocianinas (de 500
a 550 nm). Dicho método simple puede usarse, si se necesi-
ta para las partes ricas en antocianinas, tales como las -
cascaras de las uvas.

Ciertas propiedades de estos pigmentos (cam -
bios de color como una función del pH ó transformación a -
derivados incoloros a través de la acción con bisulfito -
de sodio, por ejemplo), permiten una solución a este pro-
blema.

El primer método usa el efecto que en medio -
ácido las antocianinas existen en forma colorida e incol-
ra (9 y 10) en equilibrio, con la posición del equilibrio
dependiendo del pH. Consecuentemente, la diferencia en in-
tensidad del color entre los dos valores del pH (0.6 y -
3.5 por ejemplo), es proporcional a la concentración del -
pigmento.

Ya que la función del fenol no es afectada por
su variación, no interfieren otros compuestos fenólicos,-
especialmente taninos, ya que su absorción a 550 nm es la
misma en ambos valores de pH.

El segundo método utiliza el efecto de que las
antocianinas forman compuestos incoloros con el ión bisul-

fito (12), nuevamente los otros constituyentes del vino - no interfieren, y la variación en el color después de que se agrega un gran exceso de bisulfito, que es proporcional a la concentración de las antocianinas.

Ribéreau-Gayon y Stonestreet (38) han descrito maneras para aplicar estos métodos. La concordancia de los resultados obtenidos al usar estos métodos, son cercanos a pesar de que los primeros son generalmente más bajos.

Así las cantidades de antocianina en los vinos nuevos de la región de Burdeos pueden variar entre 0.2 y 0.8 g/l , dependiendo de las condiciones anuales. Este porcentaje disminuye progresivamente durante el añejamiento, y al final de aproximadamente 10 años es alrededor de 20 mg/l. Es prácticamente imposible que este valor pudiera caer a cero y que el valor mínimo (20 mg/l) sea un artificio de ensaye.

Desde otro punto de vista, no son las antocianinas sino los taninos los que juegan la función principal en el color de los vinos añejos.

ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LOS TANINOS.

Para comenzar con la determinación de compuestos fenólicos totales todos los intentos para aislar los compuestos relacionados con los taninos, aquellos que forman compuestos estables con las proteínas, han sido vanos ya que no se puede usar esto como base para un método analítico.

El mejor método para determinar los taninos condensados de las leucoantocianinas tiene la ventaja de que estos compuestos se transforman a antocianinas cuando se calientan en medio ácido. La reacción ocurre con las formas monoméricas (por ejemplo la leucocianidina 23), así como con los flavolanos (el tetrámero en 34, por ejemplo). En este último caso, la reacción rompe las ligaduras entre los 3,4-flavandioles, los cuales luego llegan a ser antocianidinas. La reacción no es total y la producción, alrededor de 20 %, depende del procedimiento que se usa, el cual debe ser seguido con exactitud. Específicamente, la eficiencia de la conversión es mayor en solución alcohólica, que en solución acuosa, pero la reproducibilidad no es tan buena. Las cantidades del análisis para una lectura colorimétrica de las antocianinas forman bases. Hasta donde se comprende con los vinos tintos el color de las antocianinas cambia poco, por sí solo, durante el calentamiento. Los resultados deben compararse con un tanino condensado como un patrón de referencia. En el instituto de enología de Burdeos, se usa generalmente un compuesto de referencia preparado en el laboratorio de J. Masquelier (Facultad de Farmacia de Burdeos) de la corteza de la piña marítima (*Pinus pinaster*).

Se ha verificado que el comportamiento de tal

muestra es bastante similar al del extracto del tanino - condensado de las semillas de uva. Este método ha sido - aplicado a los vinos tintos por Ribereau-Gayón (14), por Masquelier y colaboradores (39) y por Ribereau-Gayón y Stonestreet (40).

Por lo que respecta a las propiedades de los - taninos, se ha dado importancia a su estructura, aún más - que a su estado de condensación o peso molecular. Es impo - sible separar e identificar los flavolanos en una muestra determinada de planta, que es suficiente con encontrar - los indicios agregados que expresan el estado aproximado - de polimerización.

El método descrito por Swain y Hillis (41) - aplicado al vino (40) da V/LA el cual está relacionado - con el estado de condensación. Estas dos reacciones, son - la conversión de las leucoantocianinas a antocianinas - (LA) y la reacción con vainillina(V). Al principio la ve - locidad disminuye conforme aumenta la condensación.

Este indicio ha hecho posible algunos resulta - dos, por ejemplo, la demostración de las diferencias es - estructurales que existen entre los taninos en las diferen - tes partes del racimo (cascaras, semillas) (2). Estos re - sultados son insuficientes como para predecir de algún mo - do preciso, las estructuras de los taninos en el vino.

Recientemente, Ribereau-Gayón y Glories (42) - trataron de modificar una determinación directa sobre el - peso molecular medio (masa) de los taninos separados por - cromatografía en Sephadex G25 (43). Esta prueba se basa - en el método criométrico (método de Rast) el cual consis - te en medir los grados que logra disminuir el alcanfor, -

cuando se mezcla con sustancias en estudio. Esto dá una -
caracterización, más precisa de los taninos en el vino y-
permite seguir su evolución durante el añejamiento de los
vinos.

Sin embargo, los resultados verdaderamente sa-
tisfactorios serán informados hasta que se determinen los
diferentes polimeros en los taninos.

DETERMINACION DEL COLOR DEL VINO TINTO.

Sudraud (44) ha discutido las curvas de absorción como una función del añejamiento, el cual es la causa esencial de los cambios de color (fig. 5). Los vinos nuevos tienen una absorción máxima a 520 nm, debido a las antocianinas de la uva las cuales son las responsables del color verdadero del vino tinto. Entre esta absorción y la del ultravioleta, alrededor de 280 nm, se encuentra un mínimo de alrededor de 420 nm. Conforme se añeja el vino, el máximo a 520 nm tiende a desaparecer, cayendo a un bajo nivel en los vinos añejos, de más de 10 años (fig. 5). Esto corresponde a un aumento en el color amarillo (absorción de 420 nm), lo cual explica por qué el verdadero color se vuelve un mosaico como rojo-naranja.

La evaluación de estas curvas muestra, que no es factible usar la absorción de 520 nm de manera exclusiva para caracterizar la intensidad del color del vino, porque los vinos nuevos tienen el color exagerado en relación a los vinos añejos. Sin embargo, la suma de la absorción a 520 nm y 420 nm es una expresión satisfactoria de la intensidad del color.

Para definir la sombra o tinte del color. Sudraud (45) recomienda usar la velocidad de las absorciones a 420 nm y 520 nm.

Estos dos índices pueden ser erróneos por ser convencionales y por no definir el color en términos absolutos, pero tienen la ventaja debido a que permiten la

comparación de los vinos entre ellos mismos en varios procesos (vinificación, almacenaje, añejamiento).

Esto es por qué el método triestímulo, parece ser una complicación innecesaria, aun en la forma simplificada por la International Office of Wine and Vine (1962).

El vino no se puede diluir y medir su color, probablemente debido a la naturaleza coloidal de la materia colorante. No hay proporcionalidad entre el coeficiente de dilución y la densidad óptica. En consecuencia para obtener las lecturas de la densidad óptica en el orden de 0.5 con precisión, las lecturas deben hacerse en muestras de poco espesor. Para los vinos tintos se usan cubetas de 0.1 cm de espesor. Con D_{420} y D_{520} que representan los valores para las absorbancias a 420 y 520 nm en celdas de 1 mm de espesor. La intensidad del color y el tinte están dados por las siguientes expresiones:

$$I = D_{420} + D_{520}$$

y

$$T = D_{420} / D_{520}.$$

RESULTADOS

La tabla V da los resultados de las pruebas en los vinos tintos de las diferentes vendimias y viñas de la región de Burdeos. Estos datos muestran primero la desaparición de las antocianinas durante el añejamiento y la gran función de los taninos en el color de los vinos añejos. El vino añejo muestra una mayor relación entre los taninos y el color, que entre las antocianinas y el color. Por otra parte, los vinos mas añejos son también los más ricos en taninos. Este efecto esta relacionado al cultivo de la vid y a la fabricación del vino, lo cual tiende a producir vinos mas suaves, y por lo tanto menos tánicos. Finalmente durante el añejamiento, la relación V/LA muestra un aumento en el grado de polimerización.

La determinación de la estructura del tanino presentado en la tabla VI se obtuvo midiendo directamente los pesos moleculares.

De nuevo durante el añejamiento se encuentra un aumento en la polimerización promedio, la cual incluye de 3 a 4 moléculas de flavano elementales en los vinos nuevos. Además, al final de un largo período de añejamiento (vino de 1914), los materiales colorantes y los taninos bastante polimerizados habrán precipitado; todo aquello que permanece son formas ligeramente condensadas.

DESARROLLO DE LOS PIGMENTOS DURANTE LA MADURACION DE LA UVA .

Los estudios sobre la maduración de la uva han incluido por simplicidad, solamente las determinaciones - de la composición del jugo de uva (azúcar y acidez). La - precisión para completar estos estudios ha sido reconocida desde hace tiempo, especialmente el estudio de los - constituyentes sólidos del racimo (pellejos, semillas, ta - llos) y particularmente los compuestos fenólicos (antocia - ninas y taninos) en las uvas rojas. Esta investigación - presenta dos dificultades: la medición de las sustancias complejas, cuyos análisis han tomado mucho tiempo para - perfeccionarse, y una extracción preliminar que es indis - pensable.

Existen algunos métodos sin tacha, pero se ne - cesitan más.

La extracción cuantitativa de todos los com - puestos fenólicos de los pellejos y semillas no es posi - ble; sin embargo se ha desarrollado un procedimiento pa - trón reproducible. Usan un disolvente con propiedades fi - sicoquímicas similares al vino, se ejecutan tres extrac - ciones en frío, seguidas de dos en caliente. Esto da una - estimación de los fenóles totales y una idea de sus solu - bilidades, un factor tecnológico importante. Se hizo un - trabajo de 1969 a 1973 que involucra las dos variedades - rojas principales de dos viñedos (Merlot y Cabernet-Sau - vignon) de Burdeos. Una (P) es un Grand Cru de la región - de Médoc caracterizado por la maduración rápida, y la -

otra (SC) que madura más lentamente (46, 47).

La tabla VII muestra el desarrollo de las antocianinas y taninos del comienzo de la maduración a la madurez. Hay 3 pasos: Primero, un aumento rápido en todas las sustancias, segundo un retardo en la producción de los compuestos fenólicos; y por último una disminución al final de la maduración. Estos fenómenos se observaron en todos los estudios. Los resultados también muestran niveles de taninos relativamente altos, en el límite de la maduración, el momento que aparecen las antocianinas. De acuerdo a estos resultados y contrario a la opinión general, el prolongar el periodo de maduración no aumenta los niveles de antocianina.

Otro hecho importante se ve al comparar los datos de cuatro años sucesivos (tablas VII, IX, X, y XI). Las concentraciones de antocianina y tanino casi se duplican año tras año. Si 1970 había sido un buen año de vendimia en Burdeos, estos tres años son recientes, la variación debe ser una función de las condiciones climatológicas.

Estas tablas muestran diferencias más grandes entre los años que entre las variedades. La comparación entre los dos viñedos, ambos cultivados por los métodos tradicionales, muestra diferencias significativas. Estos experimentos demuestran la importancia del año y las condiciones climatológicas en el contenido de antocianina y tanino. Estas variaciones son mucho más importante que las de los otros constituyentes químicos (azúcares y ácidos).

EVOLUCION DE LOS COMPUESTOS FENOLICOS DURANTE LA VINIFICACION.

El cálculo de los niveles teóricos de las antocianinas y taninos en los vinos es posible, suponiendo que se lleva a cabo la extracción completa de estos compuestos de la parte del racimo. Así se ve que solamente del 20 al 30% de los posibles pigmentos de la uva en el vino, por lo tanto, parecen necesarios mejores métodos de extracción, pero este problema no es sencillo, las leyes de extracción son complejas; en el jugo hay una disolución simultánea de los compuestos fenólicos de los pellejos y semillas, y su precipitación hacia levaduras y otras partículas sólidas en suspensión. Finalmente las antocianinas inestables se destruyen en este paso.

Para verificar la parte desempeñada por las levaduras en la fijación del color (48), se prepara una muestra alcohólica sintética (10% de alcohol, 5g/l de ácido tartárico ajustado a un pH de 3.0 con hidróxido de sodio concentrado) y se agrega una solución de macerado de pellejos de Cabernet Sauvignon. Se estudió el comportamiento sin tratamiento y de una muestra a la cual se le agregaron 2 gramos de levadura fresca (*Saccharomyces ellipsoideus*) por cada 20 ml, aproximadamente 20 veces la cantidad normal en un mosto de fermentación. Los resultados (Tabla XII) muestran un aumento muy marcado en la absorción de antocianina y tanino, la cual es prácticamente instantánea.

La influencia de los tallos, se estudió también con soluciones patrón, se resume en la tabla XIII

(49). El extracto de tallo y los tallos mismos se agregan a una solución de antocianinas; la concentración de antocianina es la misma en todos los casos.

Los tallos disminuyen los niveles de antocianinas y la intensidad del color, lo cual no se observa en el extracto que contiene solo tallo. Estos pedazos ejercen sus efectos a través de la absorción más que a través de las reacciones químicas de uno de sus constituyentes.

Por supuesto, agregando extracto de tallo (muestra II) considerablemente se aumentan los niveles de taninos lo cual aumenta la intensidad del color, ligado por sí mismo al aumento en la densidad óptica a 420 nm. Este incremento en el color no está relacionado a los niveles de antocianina que varían poco y disminuyen aun muy poco en comparación con el vacío. El aumento en la densidad óptica significa que el color vira hacia amarillo; por tanto el tinte, el cual crece como una función del tiempo, que indica el cambio en los taninos. En la presencia de los tallos (muestra II), se observa también un aumento en los taninos, pero se acompaña de un gran incremento en las antocianinas y en el tinte a la vez que cambia a rojo-naranja. El gran incremento en el valor del tinte (D_{420}/D_{520}), está en este paso, más relacionado a la disminución en las antocianinas que al aumento en los taninos.

Los resultados completos están en la tabla XIV la cual muestra el desarrollo del contenido de compuesto fenólico durante la maceración. Las antocianinas aumentan hasta alrededor del sexto día y luego disminuyen. Los ta-

ninos, por otro lado aumentan continuamente, probablemente porque son más abundantes, especialmente después de que se le agregan las semillas. Sin embargo en algunos casos peculiares a las vendimias bajas en taninos, la producción de estos compuestos es la misma que la de antocianina.

La complejidad de los problemas relativa a la maceración explica, la dificultad de optimizar la extracción de los compuestos fenólicos durante la vinificación.

Se dice que el agregar sulfito ayuda a esta extracción. Esto es realmente cierto en medio sintético, pero no es valido en mostos de fermentación, y por experimentos estrictos, nunca han mostrado mayor intensidad de color en las vendimias sulfitadas contra vendimias no sulfitadas.

En la vendimia exprimida, el ácido sulfuroso se combina con los azúcares bastante rápido, tal que su poder de disolución se disipa rápidamente. Por otro lado, el ácido sulfuroso ejerce un gran efecto en el color de los vinos de vendimias mohosas al estabilizar las antocianinas inhibiendo las oxidasas capaces de destruir las.

INTERPRETACION DEL COLOR DEL VINO Y SUS CAMBIOS DURANTE - EL AÑEJAMIENTO.

Las funciones de las antocianinas y taninos.-

La mediación de los taninos y antocianinas en el color — del vino tinto (38) se ha manejado en soluciones patrón — (19). El procedimiento es como sigue:

A una solución alcohólica acuosa (10% de alcohol. 5 g/l de ácido tartárico, ajustado a un pH de 3 con hidróxido de sodio concentrado), se agrega: (a) antocianinas (alrededor de 500 mg/l) (b) taninos (alrededor de 5 gram/l), (c) una mezcla de ambas a la misma concentración. Otras condiciones requieren iones de Fe^{3+} (5 mg/l) y ventilación (tabla XV).

La antocianina es malvidin-3,5-diglucósido, y los taninos son una muestra de las leucoantocianinas extraídas de la corteza de la piña marítima (*pinus pinaster*). Los productos no son idénticos a los pigmentos de la uva natural; no obstante, se puede suponer que los efectos — observados se correlacionan, como una primera aproximación, con el color del vino tinto y sus cambios.

La observación de los resultados y las pruebas analíticas se hicieron al final de los dos meses usando — los métodos previamente descritos (tabla XV). El desarrollo del color se muestra en la figura 6. Sin la interpretación completa de todos los datos experimentales descritos en otra parte (17), los efectos esenciales son:

1.- Las antocianinas por si mismas, no son del mismo color que el vino. (figura 6, tubo 4). El color es afectado por la oxidación aun en contacto con Fe^{3+} (comparar los tubos 8,5 y 2).

2.- Los taninos por si mismos, protegidos del aire son amarillos (tubo 5) y por oxidación se tornan cafés (tubo 2). Esta oxidación es catalizada por los iones Fe^{3+} (comparar los tubos 8,5 y 2).

3.- La mezcla de las antocianinas y taninos mantenida lejos del aire es un color reminiscente de los vinos nuevos (tubo 6).

En la oxidación toman un tinte café-naranja, reminiscente del vino añejo. De nuevo en este caso el Fe^{3+} cataliza la oxidación (comparar los tubos 6, 3 y 9).

4.- Después de la oxidación, las soluciones de las antocianinas más taninos y las antocianinas solas son de un color similar (tubos 3 y 2).

5.- Los datos de la tabla XV muestran una disminución de las antocianinas en presencia de los taninos. Este nivel es de 350 mg/l en los tubos que contienen solo antocianina; de 135 mg/l en los tubos que contienen antocianinas mas taninos protegidos del oxígeno, y de 60 a 70 mg/l cuando se oxida la misma mezcla. Como una primera aproximación, este experimento representa la evolución de la materia colorante en los vinos tintos durante el añejamiento. Lo cual confirma la función de los taninos en el

color de los vinos añejos y así se demuestra que los tani
nos juegan una parte importante en el color de los vinos_
nuevos.

Existe, la posibilidad de una reacción entre -
las antocianinas y taninos, ya postulada (50). Esta reac-
ción se confirmó en otro experimento (17) usando las prue-
bas patron, las cuales siguieron la evolución de los pig-
mentos en mezclas idénticas en los tubos 1, 2 y 3 durante
dos meses. Después de dejar a los taninos que reaccionen_
resulta que las antocianinas contribuyen al color de la -
solución en un grado limitado.

El mecanismo para su reacción puede interpre-
tarse como una copolimerización entre las antocianinas y
los centros de flavano en los taninos.

El sedimento no puede ser visto en la solución,
así las antocianinas no se eliminan por precipitación. El
mecanismo propuesto en la figura 7 fué inspirado por el -
trabajo de Jurd (16) y Somers (50). El anillo de antocia-
nina central es electrofílico y su carga positiva puede -
localizarse, uno u otro en el oxígeno (35) produciendo un
ion oxonio ó bien sobre un carbon 4 (36) produciendo un -
ion carbonio. Así se puede formar una ligadura entre el -
cuarto carbón y las posiciones sexta y octava de una molé-
cula de flavano (37). Conforme al mecanismo en la figura
2, así se obtiene el dímero 38 en el cual la antocianina_
está en la forma de flavano, oxidable con flavilio, y da_
un producto final (39) el cual está en equilibrio, como -
una función del pH con la base anhidra (40). Si $R=OH$, la_
polimerización puede conducir a un flavoleno compuesto de
taninos condensados.

De acuerdo a Somers (50) esto conducirá a un pigmento positivo del vino con la estructura 39, en la cual la fracción de antocianina produce el color. Este pigmento puede separarse de las propias antocianinas extrayéndose con alcohol amílico. De otro modo considerando las antocianinas, el color de este pigmento se estabiliza en relación a las variaciones del pH y sulfitos por sustitución en el carbón 4 (51). Sin embargo, las soluciones patrón estudiadas en la primera parte, indican que en la presencia de las antocianinas, ocurre un cambio de color limitado durante la condensación oxidante de las antocianinas (tubos 2 y 3, figura 6).

INFLUENCIA DEL ESTADO FISICOQUIMICO DE LOS PIGMENTOS EN - EL COLOR DEL VINO.

El color del vino tinto no depende exclusiva - mente de los niveles de taninos y antocianinas; la fisico - química de estos pigmentos ejerce también una influencia. Los tipos de vinos relacionados, especialmente aquellos - de la misma edad, pueden tener colores los cuales no pue - den ser interpretados únicamente en base a niveles de an - tocianinas y taninos.

La tabla XVI muestra dos experimentos los cua - les compararon el vino almacenado bajo diferentes condi - ciones (46). Em ambos casos el vino más rico en antociani - nas es también aquel que está menos colorido.

La determinación del contenido de taninos no - es suficiente para explicar las diferencias en el color; - estas pueden explicarse solamente por una estructuración - diferente de las moléculas de antocianina. Más específica - mente, las moléculas de antocianina se reducirán a flave - nos incoloros (14) durante la fermentación, la cual es un proceso reductivo. La reoxidación ocurre más rápidamente - en barriles de madera, los cuales permiten mejor la pene - tración de oxígeno que los tanques de almacenamiento de - metal o barriles de mayor capacidad. Sin embargo los fla - venos por si mismos, son relativamente inestables y pue - den ser hidrolizados irreversiblemente a dihidrocalcanos (16). Esto explica la falta de relación entre la concen - tración de la antocianina y el color, independiente, por - supuesto, de la aparición eventual del dióxido de azufre - libre.

APLICACIONES PRACTICAS

1.- En los vinos nuevos las antocianinas tienen una función más importante, pero los taninos también se suman al color. Las antocianinas están presentes parcialmente en la forma incolora, después de su reducción durante la fermentación.

2.- Durante las semanas que siguen a la vinificación ocurren varios pasos simultáneamente: (a) Las antocianinas reducidas son reoxidadas, produciendo un aumento en el color, (b) Las antocianinas en forma oxidada o reducida se destruyen parcialmente, por varias reacciones químicas o por condensación con los taninos. Esto se explica porque durante ese período el color de algunos vinos aumenta, mientras que el de otros disminuye, dependiendo de las velocidades relativas de las reacciones que ocurren a la vez.

3.- Durante el añejamiento las antocianinas, tienden a desaparecer por condensación con los taninos, los cuales por sí mismos pasan por una condensación oxidante obteniéndose un cambio de color de amarillo a café-naranja. Finalmente son estos taninos los que juegan el papel más importante en el color característico de los vinos añejos.

3.- METODOS DE ANALISIS.

EL PRESENTE ESTADO LEGAL DE LOS METODOS DE ANALISIS DE VINO Y POSIBLES TENDENCIAS FUTURAS.

Los métodos analíticos usados en la industria del vino (principalmente de los Estados Unidos) se resumen en el presente trabajo y se dan los procedimientos exigidos por las agencias reglamentarias y legales, se describe la determinación de etanol, de acidez volátil, metales, pesticidas y fungicidas contaminantes. Otros procedimientos requeridos para las operaciones vinateras también se incluyen, como determinación de ácidos, azúcares, acetaldehidos, potasio, pigmentos de color, taninos, compuestos tales como diacetil, ácido succínico, varios ésteres, etc.

Entre las contribuciones de Pasteur a la industria del vino hubo varios métodos simples de análisis de vino, y su investigación ha tenido una influencia permanente en la industria del vino. Como buen químico, experimentado, él estaba seguro de que los análisis químicos revelarían la naturaleza del proceso de la fermentación alcohólica y el tipo y grado en que se estaba echando a perder en relación a ésta.

En ambos casos tenía razón.

Aun antes de Pasteur la determinación del con-

tenido de alcohol era importante para los impuestos locales, de importación y exportación. Otras aplicaciones importantes de los análisis exactos de vino han sido para detectar y determinar exactamente los aditivos de la comida; ahora hay razones legales para analizar los vinos por dióxido de azufre, cloruro o bromuro orgánico, sodio, cianuro, pigmentos diglucósidos, varios insecticidas, fungicidas etc. El control de la vinatería requiere determinaciones analíticas de hierro, cobre, proteínas, acidez total, pH, ácido tartárico, málico etc. Últimamente, el control de calidad demanda de un análisis químico exacto, para asegurar uniformidad dentro de una marca o tipo para el color, alcohol, acidez total, azúcares reductores, etc.

Por 1900 eran válidos muchos procedimientos. - Dujardin-Salleron (Francia) no solo codificó estos procedimientos sino que también produjo el equipo necesario para ellos (1). Los métodos oficiales de análisis de vino se desarrollaron pronto en Francia y en muchos otros países. En los Estados Unidos la Association of Official Agricultural Chemists comenzó desarrollando métodos de "ensayo y oficiales" para el análisis de vino a principios de 1916 (2); estos continúan al presente (3). Los métodos oficiales de análisis, ambos para referencia y propósitos de rutina están dados en el campo internacional por la Office International de la Vigne et du Vin (4) y por American and Ough (5). Para prácticas Americanas corrientes ver las referencias 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 12a. Para los procedimientos europeos ver las referencias 4, 9, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23.

Recientemente se desarrollaron en Europa métodos rápidos de 5 minutos (23a, 24, 25), y Schmitt (26) nota que en estos procedimientos semimicro (1 ml) se debe tener cuidado para evitar la pérdida de material volátil, tal como el alcohol y para hacer lecturas volumétricas exactas con los vinos de viscosidad variable.

Las pérdidas durante la destilación también deben disminuirse. Una pequeña vinatería en que se realicen unas pocas determinaciones por año, debe preferir un procedimiento sencillo, pero largo en tiempo, mientras que una vinatería grande (más de 100 determinaciones/día) puede ahorrar dinero, sin pérdida de exactitud usando un procedimiento rápido con equipo costoso. En algunos casos, particularmente en Europa, los gobiernos exigen un cierto método aunque no sea el más moderno.

Métodos requeridos por los estándares reglamentarios o legales.

Los límites internacionales para los contaminantes (4) son: arsénico 0.2 mg/litro,

acidez volátil 20 meq/litro para 10% en volumen de etanol y 1 meq por cada uno por ciento de alcohol, arriba del 10%,

plomo 0.6 mg/litro,

boro 80 mg/litro (como ácido bórico),

bromo (total) 1 mg/litro (puede ser más alto para vinos de uvas de ciertas áreas),

bromo (orgánico) 0.0

flúor 5 mg/litro,

diglucósido de malvidina 15 mg/litro,

sodio 60 mg/litro (puede ser más alto para vinos de uvas de ciertas áreas),

sulfato 1.5 gramos/litro (como sulfato de potasio).

1.- Determinación de etanol.

La determinación exacta, razonablemente rápida, y relativamente barata de etanol es el procedimiento analítico más importante para el analista de la vinatería, - no sólo se requiere por razones legales sino también para el control de la vinatería e investigaciones.

Algunos de los métodos mas usados pueden ser:

a) A pesar de su ineficiencia (y aun falta de precisión), los procedimientos de punto de ebullición (ebullométricos), son procedimientos usados comúnmente por pequeñas vinaterías y por fabricantes de vino casero.

Los métodos de la densidad, basados en la hidrometría son más populares y más exactos a pesar de que consumen tiempo. En ambos casos el equipo es simple y los hace ideales para los operadores que hacen pocas determinaciones.

c) Para operaciones a gran escala el procedimiento de la oxidación con dicromato proporciona precisión. La microdestilación y el control cuidadoso de la temperatura y la acidez hacen a el procedimiento rápido, exacto y bien adaptado a una operación de escala múltiple (27, 28).

d) La cromatografía gas-líquido (GLC) se usa cada vez más como un procedimiento rápido para determinaciones múltiples de laboratorio.

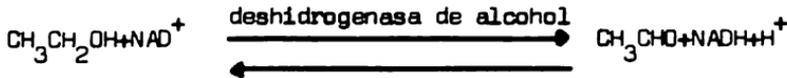
Mientras que el equipo es relativamente caro, los operadores cuidadosos obtienen rápidamente buenos resultados. No se duda que será muy usado en el futuro, por que se pueden hacer otras determinaciones simultáneamente, particularmente en un trabajo de investigación; Lie (29) usó un procedimiento de GCL que requirió solo de 3 minutos por muestra.

e) El procedimiento piconométrico para determinar el etanol es aun el método de referencia para muchos países, a pesar de que pocos laboratorios lo usan como rutina.

En los casos en que se involucran transacciones comerciales es el preferido, especialmente porque los cálculos se pueden simplificar.

f) El etanol también se puede determinar usando deshidrogenasa de alcohol y midiendo el cambio en el -

dinucleótido de adenina-nicotinamida (NAD) a la forma reducida (NADH) a 340 nm.



La solución alcalina es regulada, y se agrega semicarbazida para eliminar el acetaldehído, obligando a que la reacción se desplace hacia la derecha.

Este método se usa a bajas concentraciones de alcohol (30).

2.- Determinación de metanol.

En los vinos de uva y brandies la determinación de metanol es raramente necesaria, excepto donde se usan cantidades excesivas de bagazo; las normas italianas limitan el contenido de metanol por esta razón. Con vinos de fruta y brandies de fruta el máximo legal se puede exceder fácilmente y ante esto se requiere una determinación de metanol.

a) El metanol se puede oxidar a formaldehído, el cual desarrolla un color rosaanilina o ácido cromotrópico (indicador).

b) La cromatografía gas-líquido también se ha

usado (31). Martin Et al (32) encontraron buenos resultados entre los dos procedimientos a altas concentraciones de metanol.

3.- Determinación de acidez volátil.

a) El ácido acético es el ácido primario formado durante la descomposición del vino. Los límites legales para esto existen en todos los países productores de vino, variando de 0.10 a 25% exclusivo de dióxido de azufre y ácido sórbico. Los límites de los Estados Unidos y en el estado de California se encuentran los más bajos.

La práctica de la buena vinatería demanda que las determinaciones exactas de la acidez volátil, se realicen durante el procesamiento y almacenamiento antes de salir al mercado.

a) El método corriente (3, 4, 6, 22) involucra destilación de vapor para separar los ácidos volátiles (primordialmente acético) de los ácidos no volátiles (fijos). Se ha inventado un equipo especial para esta separación (6). Los contenidos de ácido sórbico y sulfuroso se pueden corregir, o se puede eliminar el ácido sulfuroso (33). El dióxido de carbón se puede eliminar de tal manera que no interfiera con la prueba (6, 33). Un procedimiento automatizado también es válido (34), el cual mide los ácidos volátiles en el destilado a 450 nm usando azul de bromofenol.

Es probable que la determinación por cromato-

grafía gas-líquido de ácido acético, distinta de los ácidos volátiles (propiónico, láctico etc), se use con más frecuencia. Un procedimiento enzimático específico para el acetato (35) revela que solamente alrededor de dos terceras partes de la acidez volátil es ácido acético. Sin embargo la acidez volátil de los vinos comerciales en las vinaterías modernas está generalmente muy por abajo de los límites legales.

4.- Determinación de dióxido de azufre.

Los límites legales para el dióxido de azufre total en los vinos varía de 200 a 350 mg/litro. En adición, el límite para el dióxido de azufre no ligado a los aldehídos, compuestos polifenólicos, etc., puede ser de 30 a 100 mg/l. El control de la vinatería requiere que la cantidad de dióxido de azufre presente durante el procesamiento y añejamiento sea cuidadosamente controlado y que el aumento en el interés por la salud pública refuerce esto.

Para la determinación del dióxido de azufre total, se prefieren los procedimientos de destilación (3, 4, 6, 22). La atención cuidadosa a los detalles es necesaria ya que los métodos son empíricos (16, 36, 37).

El problema de determinar exactamente el dióxido de azufre no ligado (libre), no ha sido resuelto satisfactoriamente (6, 7, 40) y la mejor aproximación es destilar la muestra en ausencia de aire y reconocer que el procedimiento usual sobreestima los dióxidos de azufre no li

gados (iones) (41, 42, 43).

Por esta razón algunos países (por ejemplo - Estados Unidos) no especifican un límite para dióxidos de azufre no ligados (libres). Sin embargo, en la práctica - de vinatería se necesita un límite, y en países donde - existe un límite legal, se requiere la determinación.

b) La titulación yodométrica de Ripper se usa aún, pero está sujeta a error. En su lugar, se usa la titulación yoduro-yodato (44). Esto es seguido por la preparación del dióxido de azufre con glioxal en una segunda muestra y se valora por retroceso. La diferencia representa el dióxido de azufre libre. La segunda titulación representa de manera tosca la cantidad de reducción y la cantidad de ácido ascórbico presente. Las fórmulas para calcular la cantidad de dióxido azufre para agregar con objeto de producir un nivel predeterminado de dióxido de azufre libre han sido dadas por Stanescu (45).

A) Determinación de metales contaminantes.

Hay un interés creciente en el plomo, sodio y otros constituyentes metálicos del vino. El límite real de plomo es de 0.6 mg/l. Mientras que el de sodio es un constituyente normal de los vinos, las resinas intercambiadoras de cationes pueden aumentar los límites sugeridos para el sodio, que varían de 60 a 300 mg/l en los diferentes países.

B) El límite internacional sugerido para arsénico de 0.2

mg/l que no sería difícil de encontrar. Los insecticidas a base de As no se usan en los Estados Unidos y son raramente usados fuera del país. Mientras que las pruebas sencillas para la presencia de arsénico son válidas, su determinación cuantitativa requiere tiempo, involucra calcinación, equipo especial, técnica meticulosa y limpieza.

C) El plomo también debería aunque raramente se encuentra cerca del límite sugerido de 0.6 mg/l. El procedimiento por calcinación y desarrollo del color con ditizona (u otro agente complejante), también consume tiempo y es técnica meticulosa. Aún con espectrofotometría de absorción atómica hay pérdidas en la calcinación. Probablemente los mejores y los más recientes procedimientos son aquellos donde el vino se reduce a cenizas directamente en el aparato.

D) El boro (como ácido bórico) tiene un límite internacional sugerido de 80 mg/l. La fuente probable es el suelo o el agua de irrigación y son válidos varios procedimientos para su determinación.

E) El flúor (ó fluoruros) tiene un límite internacional sugerido de 5 mg/l. La captación de flúor ocurre sólo en el raro caso de que los tanques de concreto pudieran haber sido tratados con fluorsilicato. Con la desaparición de los tanques de concreto y la prohibición del fluorsilicato, el cual puede contaminar la comida, en lo que esta determinación sería superflua. Se hace en muestra reducida a ceniza de ácido fluorsilícico con vapor sobrecalentado y titulación con nitrato de torio en presencia de sulfonato de alizarina.

F) El bromo (como bromuro), puede exceder ocasionalmente el límite sugerido de 1 mg/l, en áreas donde las uvas crecen en suelos que contienen sal. Aquí se puede aplicar un límite más alto ya que el bromuro no es tóxico a este nivel. La determinación involucra calcinación. La adición de cloramina T en la presencia de fenolsulftaleína conduce a la formación de tetrabromosulftaleína la cual es colorida.

El bromo orgánico tiene una tolerancia de cero debido a la toxicidad informada del ácido monobromoacético. Se puede extraer cuantitativamente con éter a pH 1. Su determinación es entonces igual a la del bromuro total - (4).

G) El sulfato (como sulfato de potasio) ha sido muy limitado, para reducir la adición de sulfato de calcio (emplastando). La práctica de bajar el pH que está limitado a regiones de clima caliente donde la acidez es muy baja (pH alto). El límite de 2 y 3 gram/l de varios países es más alto que el sugerido de 1.5g/l.

La precipitación como sulfato de bario requiere ebullición en ausencia de aire para quitar el dióxido de azufre. (Se puede usar el residuo del procedimiento de destilación para dióxido de azufre). Se necesita habilidad para manejar el precipitado requerido para obtener resultados exactos. Es posible la titulación complejométrica después de la precipitación como sulfato de plomo (4). Usando tres soluciones que contengan diferentes cantidades de cloruro de bario, es posible determinar rápidamente por oscurecimiento, si un vino contiene más o menos -

0.7, 1.0 ó 2.0 g/l de sulfato de potasio.

H) El nitrato es de interés como un posible indicio de agua. Muchas aguas potables contienen 30 mg/l de nitratos, siendo que los vinos contienen alrededor de 4 a 5 mg/l en promedio (46, 47, 48). El presente procedimiento recomendado (49) es la reducción de nitrato a nitrito seguido por la determinación colorimétrica con ácido sulfanílico y α -naftilamina.

Otros metales raramente están presentes en cantidades que se acercan a los límites de la sanidad pública (ver su determinación en la práctica de vinatería normal).

La espectrofotometría de absorción atómica es el método preferido (50,51). Para revisiones recientes de este procedimiento para su aplicación a los vinos vease (52), (53). La espectrofotometría fluorescencia de rayos X también se ha usado (54).

I) Pigmentos de antocianina diglucósidos.- No existen límites en las cantidades de los pigmentos de antocianina de diglucósido en los Estados Unidos. En Europa se ha sugerido un límite 4 mg/l de malvina (22). El límite tiene más significado económico que cualquier daño a la salud.

Los procedimientos de cromatografía en papel y en capa fina son válidos cuando se requiere esta determinación (principalmente en Alemania) (4, 22, 55, 56, 57, 58).

J) Dióxido de carbono.- El límite de los Estados Unidos - para el dióxido de carbono en los vinos no espumosos es - 2.77 g/l, arriba de este valor los impuestos se elevan de 17 ¢ por galon a \$ 2.40 ó \$ 3.40. Otros países tienen límites menos estrictos. Obviamente se requiere un método - más exacto y son válidos varios (4, 5, 6).

En el presente se requiere una simple reacción enzimática usando anhidrasa carbónica. El ion bicarbonato se titula con ácido valorado con pH entre 8.6 y 4.0. La - anhidrasa carbonica asegura que el ácido carbónico este - todo en forma de bicarbonato. Se obtiene así un punto final sin pérdida de color.

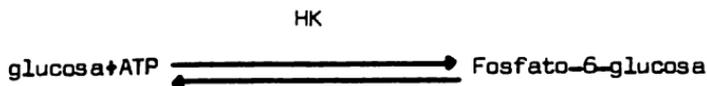
K) Azúcar y Extracto. La glucosa y la fructosa son los - principales azúcares reductores presentes en los mostos - y vinos. Aun cuando la sacarosa este presente, esta se hidroliza en pocos días a pH relativamente bajo o por la secarosa.

L) Los procedimientos de cobre gravimétricos clásicos han sido usados por muchos años y son aun el estandar, a pe - sar de ser exactos, requieren tiempo. Los enólogos ameri - canos generalmente prefieren el procedimiento titulimétrico de Lane y Eynon (3, 4, 6).

El procedimiento enzimático de Drawert y Ku - pper (59) permite la determinación de la glucosa, fructo - sa, y (cuando es necesario) la sacarosa.

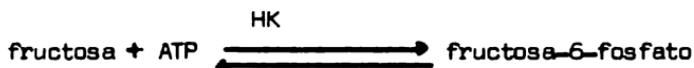
La glucosa reacciona con el adenosintrifosfato (ATP) en presencia de hexoquinasa (HK) para producir fos-

fato-6-glucosa.



Agregando deshidrogenasa de fostato-6-glucosa en presencia de trinucleótido de adenina de nicotinamida oxidado (NADH) se produce ácido-6-fosfato glucónico y una cantidad equivalente de la forma reducida, NADPH.

A el NADPH se le puede medir de su absorbancia a 340 nm. Para la fructosa la primera reacción es:



La fructosa-6-fosfato se convierte a glucosa - 6-fosfato en la presencia de fosfoglucosoisomerasa (PGI).

Los trimetilsilil derivados de los azúcares - se pueden separar por cromatografía gas-liquido (60). Para mostos, donde el 90% ó más de los sólidos solubles son - glucosa y fructosa, los procedimientos aproximados son ge - neralmente eficientes (hidrometría ó refractometría). Ya que el contenido de azúcar es arriba de 1%, generalmente, (5, 6, 61, 62, 63). Los procedimientos espectrofotométricos son rápidos, especialmente si no requieren filtración o decoloración (62). La adición fraudulenta es muy diff - cil de detectar (22), porque la sacarosa agregada se hi - droliza rápidamente. Los agentes sintéticos de endulza -

miento en los vinos se pueden detectar por cromatografía en capa fina (64, 65), ó por cromatografía gas-líquido.

Los sólidos solubles de la decoloración se conocen como el extracto. Los mostos de bajo azúcar o acuosos y los mostos azucarados tienen un contenido de extracto bajo. El extracto mínimo en los Estados Unidos es 1.6 y 1.8 g/100ml para los vinos tintos y blancos de mesa - respectivamente. Estos límites son tan bajos que en los vinos de mostos acuosos se encuentran difícilmente.

Mientras que el concepto de extracto no es ambiguo, relativamente su definición precisa es difícil. El problema es como desalcoholizar el vino sin pérdida de sólidos solubles, sin azúcar (ácido láctico, glicerol, etc). La definición empírica (4) es para especificar una temperatura (70°C), grado de vacío (20-25 Torr), período de tiempo (1 h, más de enfriamiento), y otras condiciones.

La fórmula de Taberlé se usa generalmente como sigue:

$d_v = d_w - d_n + 1.000$ donde d_v es la densidad del residuo, d_w es la del vino (menos la acidez volátil y el dióxido de azufre), y d_a la del alcohol (ambas a 20°C).

Las tablas para convertir la d_v a gramos de extracto por 100 ml son válidas, pero la tabla propia para usar es la tabla de sacarosa, no la tabla empírica de Ockerman (66).

Pesticidas y fungicidas. Las reglamentaciones modernas de bebidas puras requieren que el procesador de la bebida, sea responsable de sus productos terminados, ya que se usan tantos pesticidas y fungicidas en la agricultura, que su detección y análisis cuantitativo son difíciles (5, 22).

Los hidrocarburos organofosforados y clorina - dos son los pesticidas más comunes. Estos se pueden detectar por medio de la cromatografía gas-líquido usando detectores microcoulométricos ó de captura de electrón para los halógenos y para el fósforo se requiere detector - fotométrico de flama termiónico.

Cuando el aditivo específico no es conocido, los procedimientos más sencillos se pueden desarrollar (67). Algunos insecticidas pueden detectarse a partir de su efecto en la actividad de la colinesterasa (68).

Aditivos prohibidos. El dietil pirocarbonato (DEPC) está ahora prohibido en los Estados Unidos y otros países. Ya que una pequeña cantidad de dietil carbonato es un subproducto constante de uso y fácil de detectar con GLC, los vinos a los cuales se les ha agregado DEPC son fáciles de detectar (69, 70, 71).

El ferrocianuro de potasio ha sido usado por mucho tiempo para quitar el exceso de cobre y fierro de los vinos. Cuando no se usa en exceso parece efectivo e inofensivo, pero si queda algún residuo de ferrocianuro, se puede formar cianuro. Mientras que las cantidades producidas por un ligero exceso, no son de mucho peligro, el

precipitado azul y el color característico serán indeseables. Se ha provisto de equipo especial para detectar el cianuro y ferrocianuro libres (4, 5, 6) como azul de Prusia. El límite sugerido es de 1 mg/l como cianuro.

Hoppe y Romminger (72) improvisaron un procedimiento rápido para cianuro libre y unido al Ba, que da una proyección cualitativa, sensible para 0.05 mg/l (73).

Raramente se agrega ácido benzóico o salicílico, encontrados en los mostos o vinos a pesar de que el ácido salicílico se usó a lo largo del siglo. Las pruebas de color sensibles son válidas para su detección (3, 5, 6, 22, 74).

Antes de la segunda guerra mundial los ácidos monocloroacético y monobromoacético fueron usados en los Estados Unidos y en Europa, pero ahora están prohibidos. Para detectar bromuro orgánico o cloruro se usa comúnmente la extracción líquido-líquido, seguida por la destrucción de la materia orgánica y se usa el procedimiento de Volhard ó los procedimientos clásicos para determinar halógenos. Los electrodos de ion selectivo también se pueden usar como la cromatografía en capa fina (75). La cromatografía líquido-gas, particularmente de los trimetilsilil derivados, puede detectar algunos aditivos, ácido hidróxi benzóico por ejemplo (60).

MÉTODOS REQUERIDOS EN OPERACIONES VINATERAS.

Los procedimientos usados en las operaciones vinateras, varían mucho dependiendo del tipo de productos producidos en su mercado. Una pequeña vinatería que produce solamente un tipo de vino tinto puede necesitar solamente unos cuantos análisis diferentes. Una vinatería que produce jugo de uva, concentrado de uva, vinos de mesa, vinos de postre, vinos naturales especiales (saborizados), vermouth, vinos de fruta, espíritus de alta prueba y brandy comercial requieren diferentes tipos de análisis.

Acido total. Los procedimientos de la titulación sencilla se usan para determinar la acidez total. Surgen problemas debido a que las cantidades de los diferentes ácidos en los vinos varían mucho: tartárico, málico, cítrico, láctico, succínico, acético, etc. Los diferentes valores de pK_a para estos ácidos hacen imposible predeterminar fácilmente el pH correcto en el punto final. Ya que se usa una base fuerte para titular los ácidos relativamente débiles, el punto final tendrá un valor de pH mayor de 7. En los Estados Unidos se han usado los puntos finales de fenolftaleína (8.3) ó rojo cresol (7.7) ó un medidor de pH a 9.0 (3, 6, 12, 76, 77); y los resultados se expresan como ácido tartárico. El resultado a pH de 7.7×1.05 aproximadamente equivale al del resultado obtenido de titular a pH de 8.4. En Europa el pH de 7 es generalmente el punto final, en Francia los resultados se expresan como ácido sulfúrico y en Alemania como tartárico ó en miliequivalentes (78).

Acido fijo. El ácido total (como tartárico) menos la acidez volátil (como tartárico) es la acidez fija. Es usual hacer este cálculo cuando se sospecha de la actividad de la bacteria reductora de ácido, como en la fermentación malo-láctica.

Acido málico. Este raramente se determina cuantitativamente en la práctica vinatera. Sin embargo, la cromatografía en papel cualitativa se hace a menudo para seguir la fermentación maloláctica. Usando alcohol n-butílico y ácido fórmico (80), los valores de R_f son: tartárico 0.28, cítrico 0.45, málico 0.51, tartrato ácido de etilo 0.59, ácido láctico 0.78, succínico 0.78 y malato ácido de etilo 0.80.

Para los resultados cuantitativos no es válido el procedimiento. Los procedimientos enzimáticos (81) que usan deshidrogenasa de L-málico sufren de la posible interferencia por *Schizosaccharomyces pombe* (83). El procedimiento colorimétrico con ácido 2, 7-naftaleno disulfónico (84) es tal vez el que más se practica.

Acido tartárico. Las medidas cuantitativas del tartrato total se usan en la determinación de la cantidad de la reducción de ácido requerida para los mostos de acidez alta y en predecir la estabilidad del tartrato de los vinos terminados, se pueden usar tres procedimientos.

a) La precipitación como racemato de calcio - que es exacta (85), pero por el costo y la falta de validez del ácido L-tartárico se prohíbe.

b) La precipitación del ácido tartárico como bitartrato de potasio, que es el procedimiento más viejo, pero es algo empírico debido a la solubilidad apreciable del bitartrato de potasio. No obstante es aún un método oficial de la AOAC (3).

c) El procedimiento colorimétrico de metavanadato se usa mucho (4, 6, 86, 87) (88) (89).

Acido láctico. Los datos cualitativos y aún los semicuantitativos se obtienen por cromatografía en papel. El procedimiento cuantitativo se basa en la oxidación del ácido láctico a acetaldehído y el acetaldehído se determina colorimétricamente (4, 13, 22, 90).

Acido cítrico. Este ácido se determina raramente en los vinos ya que solamente está presente en una pequeña cantidad. Sin embargo, debería usarse para modificar la prueba del ácido, los límites deberían ser impuestos y su determinación, es necesaria. Son válidos los procedimientos enzimáticos (22, 91, 92) y colorimétricos (93, 94).

Determinación simultánea de ácidos. La determinación de los trimetil silil derivados de los ácidos orgánicos por cromatografía de gases se ha desarrollado como un método para su determinación y detección cuantitativa (60, 95).

pH. Debido a que afecta el crecimiento de los microorganismos, el color, el sabor, la relación de bioxi

b) La precipitación del ácido tartárico como bitartrato de potasio, que es el procedimiento más viejo, pero es algo empírico debido a la solubilidad apreciable del bitartrato de potasio. No obstante es aún un método oficial de la AOAC (3).

c) El procedimiento colorimétrico de metavanadato se usa mucho (4, 6, 86, 87) (88) (89).

Acido láctico. Los datos cualitativos y aún los semicuantitativos se obtienen por cromatografía en papel. El procedimiento cuantitativo se basa en la oxidación del ácido láctico a acetaldehído y el acetaldehído se determina colorimétricamente (4, 13, 22, 90).

Acido cítrico. Este ácido se determina raramente en los vinos ya que solamente está presente en una pequeña cantidad. Sin embargo, debería usarse para modificar la prueba del ácido, los límites deberían ser impuestos y su determinación, es necesaria. Son válidos los procedimientos enzimáticos (22, 91, 92) y colorimétricos (93, 94).

Determinación simultánea de ácidos. La determinación de los trimetil silil derivados de los ácidos orgánicos por cromatografía de gases se ha desarrollado como un método para su determinación y detección cuantitativa (60, 95).

pH. Debido a que afecta el crecimiento de los microorganismos, el color, el sabor, la relación de bioxi

do de azufre libre a total y la susceptibilidad para la turbiedad de fosfato de fierro, el pH se mide como una guía para la práctica de la vinatería. Se usan los pHmeters ordinarios.

Acetaldehído. En la operación de rutina se mide rara vez, sin embargo en la producción de cereza, ya por la capa de levadura ó los procesos de cultivo sumergidos, es necesaria la determinación en forma regular de acetaldehído.

Los principios del procedimiento clásico de Jaulmes y Espezal (3, 96, 97) aún se usan. Para prevenir los cambios oxidantes de cobre catalizado, se agrega EDTA para complejar al cobre (98). El alcohol isopropílico tiene el mismo efecto (99).

Hidroximetilfurfural. Cuando el mosto ó los vinos que contienen fructosa se calientan, se produce hidroximetilfurfural. El cual es fácil de detectar cualitativamente; los límites de este calentamiento sirven en Alemania para prevenir el sobrecalientamiento de la uva y de los jugos de fruta, y en Portugal para prevenir el añejamiento artificial del vino de oporto por calentamiento. La cromatografía en papel y en capa fina y los procedimientos espectrofotométricos, son los recomendables (6, 23, 89, 131).

Acido sórbico y sorbatos. En adición a la corrección de la acidez volátil para el ácido sórbico ya mencionado, el ácido sórbico y los sorbatos se deben determinar directamente. El procedimiento colorimétrico

(10) es el apropiado: la oxidación del ácido sórbico a - dialdehído malónico produce un color rojo que se desarrolla por la reacción con ácido 2-tiobarbitúrico (4).

Sorbitol y manitol. El sorbitol está presente en las frutas pero no en las uvas. Se requiere un método para su determinación para detectar la mezcla ilegal de los vinos de fruta con los vinos de uva. El manitol es producido por la descomposición bacteriana. La deshidrogenasa y la cromatografía en capa fina se recomiendan para su determinación (5).

Glicerol. Hoy el glicerol se determina rara vez, excepto en los trabajos de investigación, la cromatografía gas-líquido parece ser el método de alternativa (105) a pesar de que el procedimiento enzimático es directo y exacto (22, 106).

Cobre. En presencia de dióxido de azufre la turbiedad proteína-cobre puede desarrollarse en los vinos blancos. Solo pequeñas cantidades de cobre (alrededor de 0.3 a 0.5 mg/l), usan turbiedad. El uso del acero inoxidable en las vinaterías modernas ha reducido la concentración de cobre, pero muchas vinaterías hacen pruebas de cobre de rutina a sus vinos. La espectrofotometría de absorción atómica es el método de alternativa (51) a pesar de que los azúcares reductores y el etanol interfieren, se recomienda la quelación y la extracción con acetona (108). Si se hacen eficientes los procedimientos colorimétricos se pueden usar, especialmente con dietilditiocarbamato (3, 4, 6, 10, 22, 109). (110).

Fierro. El fierro en exceso en los vinos causa turbiedad, que interfiere con el color y puede impartir sabor. El mecanismo de la precipitación de fosfato férrico se ha estudiado intensamente y se han desarrollado numerosos métodos colorimétricos. Para propósitos de rutina el color desarrollado con tiocianato es adecuado (6, 9), pero muchos enólogos prefieren los procedimientos de la ortofenantrolina (3, 4, 6, 22). Meredith (III) obtuvo los mismos resultados esencialmente para fierro usando 2, 4, 5-tripiridil-s-triazina (TPTZ) para desarrollar el color. La espectrofotometría de absorción atómica se puede usar pero, como con el cobre, son necesarias las correcciones para reducir el azúcar y el etanol (51).

Potasio. Los estandares de calidad para los vinos embotellados requieren ahora un alto grado de claridad. Aun los precipitados ligeros de tartrato ácido de potasio se consideran perjudiciales. Ya sea que se estabilizan los vinos por tratamiento en frío, un largo añejamiento o intercambio de iones, la determinación del contenido de potasio puede ser necesaria. La precipitación como tartrato ácido (6) se usa mucho. Sin embargo la precipitación como tetrafenilboruro de potasio se usa mucho en Europa (4, 22). La fotometría de flama y la espectrofotometría de absorción atómica se usa con el equipo necesario (5, 22, 112).

El sodio se ha discutido junto con las restricciones legales.

Calcio. El calcio en exceso se puede encontrar en los vinos almacenados en tanques de concreto o expuestos al calcio de otro modo (filtros de bentonita de cal -

cio, etc.). Después de que se embotellan los vinos, el - tartrato ácido de calcio puede precipitarse lentamente.

La titulación complejométrica con EDTA es el - procedimiento que se usa en la vinatería para determinar - el calcio (4, 6, 22, 113), pero la espectrofotometría de - absorción atómica (51, 53, 112) y la fotometría de flama - y un método micro rápido (114) se han usado con bastante - éxito.

Tanino. Los compuestos fenólicos son de suma - importancia en la operación vinatera para predecir el - agente afinante propio y el método de afinación como una - medida de la edad y sabor del vino, como un indicio del - grado de oxidación que el vino tolerará, etc.

Los métodos patrones actuales (3, 4, 5, 6, 22) usan el reactivo de Folin-Ciocalteu (115, 116), el ácido - gálico se usa para preparar la curva patrón a 765 nm. Se - usan los métodos de Singleton y Esau (117) y P. Ribéreau - Gayon (118, 119) para fenólicos totales y para separar - las fracciones fenólicas.

Histamina. La presencia de pequeñas cantidades de histamina en los vinos está ahora bien establecida. Es - tas cantidades estan generalmente abajo de aquellas que - pueden tener efecto fisiológico. Un método para determi - nar la histidina y la histamina simultáneamente es válido ahora (120). La precisión y sensibilidad fueron 0.05 mg/l y 0.025 μ g/ml y 0.7 mg/l y 0.75 μ g/ml respectivamente.

Color. La especificación del color ha venido a ser más importante, ya que muchos productores venden grandes volúmenes de vinos específicos a una clientela nacional.

Hay el problema adicional de vinos blancos de color bajo (5).

El procedimiento usual es preparar una curva de absorción en el espectro visible. A partir de esto se determinan los coeficientes tricromáticos y el requisito de parámetros de tres colores se obtiene; luminiscencia, longitud de onda dominante y pureza. El procedimiento es algo laborioso, se usan a menudo métodos más cortos. Para los vinos blancos, los cambios en la absorción a 420 y 430 nm son adecuados para detectar los cambios al café. Para los vinos tintos se mide la absorbancia a 420 y 520 nm. La relación de estos corresponde con los cambios en el tinte o matiz (longitud de onda dominante). La suma de las dos absorbancias es una medida aproximada de la luminiscencia (brillantez). Este método detecta los cambios de color en la mayoría de los vinos tintos (121), aunque el ojo humano puede detectar diferencias aun más pequeñas (122).

MÉTODOS REQUERIDOS EN LA INVESTIGACION

La investigación enológica requiere muchos procedimientos diferentes, dependiendo de las necesidades del experimento. La investigación de los constituyentes del sabor requiere las técnicas más sofisticadas de la química orgánica moderna.

Entre los compuestos comúnmente determinados en la investigación de los laboratorios están el diacetil, el 2,3-butandiol, el glicerol, el ácido citramálico (especialmente prolina), histamina, amonio, ácido succínico, fosfato, ceniza, la alcalinidad de la ceniza, etil, acetato, antranilato de metilo, ésteres volátiles totales, compuestos fenólicos, etc.

La cromatografía de gases es un método para determinar los ésteres etílicos de los ácidos caprónico, caprílico y láurico usando extracción con disulfuro de carbono (123).

Los estándares de calidad para algunos constituyentes del sabor son eventualmente desarrollados, linalool para muscats por ejemplo, y tal vez fenetanol. Se ha sugerido (60) que el descubrimiento de la actividad bacteriana a partir de la presencia y cantidad de subproductos bacteriales menores (arabitol, eritritol, y manitol) puede ser útil.

En base a la cromatografía gas-líquido se ha logrado la determinación de carbonilos, esterés y alcoholes superiores, las cervezas se clasificaron exactamente en tres categorías (125). El contenido de antocianinas se determinó cuantitativamente usando valores de absorbancia molar para cinco pigmentos de antocianina(126).

TENDENCIAS FUTURAS

La cromatografía gas-líquido, la espectrofotometría de masas y absorción atómica, los procedimientos colorimétricos específicos y enzimáticos parecen ser los métodos probables para el uso de rutina en el futuro. La automatización será común.

La cromatografía gas-líquido se usa ahora para detectar los vinos de imitación de muscat (127). El sabor característico de los subproductos de la levadura se puede detectar y medir. La correlación múltiple de las cantidades de los constituyentes mayores y menores más influyentes con la calidad del vino es el propósito de tal investigación. Se ha montado un aparato sencillo para la determinación del potencial redox (2 electrodos de platino), pH, conductividad específica, oxígeno y dióxido de carbono (electrodo de ión selectivo) (128).

El oxígeno molecular en los vinos ha sido determinado por varios procedimientos analíticos, polarografía, (129) y cromatografía gas-líquido. Los enólogos es -

ten usando ahora una variedad de procedimientos analíticos. Es difícil predecir las fuentes de los nuevos métodos, pero los que se usan comúnmente parecen tender a ser procedimientos rápidos y automatizados, algunos basados en la colorimetría y otros basados en la refractometría. La cromatografía gas-líquido ya se usa mucho, pero cuando se une con un sistema impresor especial integrado, el método se vuelve aun más atractivo.

La cromatografía líquida de alta presión es usual para los compuestos no apropiados por cromatografía gas-líquido. Se recomienda para separar y medir exactamente los ácidos fenólicos y los flavanoides en los vinos tintos (130). La cromatografía en capa fina se ha usado también en la investigación y a través de las técnicas de medición rápida, se puede encontrar una mayor aplicación. Los electrodos de ión selectivo también parecen ser siempre útiles. El análisis fluorométrico ha sido usado para los análisis, pero se puede tener un uso mayor, si se controla el desarrollo en ciertos constituyentes, tales como la histamina, bajo el cambio de la regla de la tolerancia cero (Delaney) puede requerir muchos procedimientos analíticos nuevos de muy pequeñas cantidades de ciertos derivados de algunos componentes de los vinos o de los aditivos. Obviamente el futuro enólogo tendrá que ser tan sofisticado en el laboratorio de análisis como en el examen sensitivo.

ANALISIS DE VINOS Y LICORES

Definición: Se denomina vino al producto elaborado por la fermentación alcohólica normal de jugo de uvas sanas y maduras, modificado por el usual tratamiento en la bodega. En Estados Unidos y otros países se producen cantidades relativamente pequeñas pero significativas de vino a partir de pasas, manzanas, moras, peras, cerezas, naranjas, grosellas, albaricoques, toronjas, granadas, frambuesas, melocotones y fresas; un vino producido a partir de uno de estos frutos o sustancias se denomina (si carece de nombre propio específico), se especifica la procedencia; por ejemplo, vino de melocotones.

Dentro de los vinos propiamente dichos, elaborados de uvas, se distinguen cinco clases: vinos aperitivos, tintos, blancos, de postre y espumosos.

Determinados términos especiales se utilizan también para describir vinos; vinos ordinarios son los que no contienen bióxido de carbono se incluyen los de mesa, de aperitivo y postre; vinos espumosos son los que se hicieron espumosos durante una fermentación secundaria en la botella o cuba, o bien se carbonataron; vinos secos son los que no contienen azúcar, o si lo hay es en pequeña cantidad, que no resulta fácil apreciarlo por la percepción gustativa.

Los contenidos alcohólicos de las cinco clases de vinos son distintos; los de mesa, tintos y blancos, así como los espumosos contienen de 10 a 14% de alcohol en volumen; los aperitivos y de postre, alrededor del 20%.

Composición de la materia prima.

El compuesto más importante es el azúcar, pues to que de él procede el alcohol del vino. Las uvas contienen de 15 a 25% de azúcar, pero a veces se fermentan uvas parcialmente secas que contienen hasta 30 ó 40%. Los ácidos orgánicos figuran en segundo lugar entre los componentes más importantes del fruto. En las uvas, son casi en su totalidad ácidos málico y tartárico; el porcentaje varía según el estado de madurez, la variedad y las condiciones climáticas de la estación o de la región de cultivo. En las uvas se encuentran sólo una pequeña cantidad de materia nitrogenada, que tiene una importancia considerable para la nutrición de la levadura y para la estabilidad bacteriana.

Los pigmentos de las uvas y de otros frutos se encuentran ordinariamente en las células de la epidermis.

Durante la fermentación alcohólica, las células mueren y sueltan estos pigmentos; separando la piel de las uvas negras del mosto, antes de la fermentación, es posible obtener un vino blanco ó casi blanco.

Los componentes inorgánicos no son de importancia crítica, pues ordinariamente se encuentran en cantidades suficientes para el metabolismo de las levaduras o de las cenizas, pero el hierro y el cobre en exceso pueden originar turbiedad.

Los vinos se producen normalmente por la fermentación

tación con la levadura *saccharomyces cerevisiae*, var *- ellipsoideus*; esta y otras levaduras se encuentran en las uvas y otros frutos y se multiplican rápidamente en los zumos dulces, causando la fermentación.

Vinos blancos.- Son aquellos que contienen menos de 14% de alcohol; los hay secos y dulces, ordinariamente se obtienen a partir de uvas blancas. El problema básico en la producción de los tipos secos, es la obtención de un vino que conserve un color claro y un olor fresco, sin oxidar. Los de tipo dulce son difíciles de producir y más difíciles de estabilizar, porque contienen sólo de 13 a 14% de alcohol y puede contener de 0.5 a 20% de azúcar; el problema es doble, en primer lugar hay que conseguir un mosto que tenga un contenido de azúcar tan alto que produzca 13% de alcohol y quede todavía azúcar residual; en segundo lugar, la fermentación debe interrumpirse cuando el alcohol llegue a 14% y esto no siempre es fácil.

Vinos tintos.- Un gran porcentaje del vino mundial es el vino tinto de mesa con menos de 14% de alcohol; son relativamente fáciles de producir en comparación con los blancos y son menos propensos a avinagrarse durante el envejecimiento. La vendimia debe efectuarse cuando las uvas están lo suficiente maduras para producir de 11-13% de alcohol, en el caso de que así lo permitan las condiciones climáticas; se obtienen de la vinificación de mostos de uvas cuyo jugo es tinto.

Vinos espumosos.- Son aquellos que contienen exceso visible y permanente de bióxido de carbono. El nombre más famoso es el de champaña, que originalmente se -

producía en una sola región de este nombre en Francia. Los vinos destinados a fermentación secundaria han de ser producidos de un modo especial; las condiciones para los espumosos son: 10-11 % de alcohol, pH de 3.0-3.4, acidez volátil baja, sabor a fruta fresca, color claro sin oxidar y ausencia de todo olor y sabor desagradables.

Vinos de postre.- Son vinos encabezados o de postre, con un contenido de 19-21 % de alcohol. Se producen vinos de postre tintos y blancos, los blancos pueden ser secos o dulces.

Acabado del vino.- Las prácticas de envejecimiento, mezcla, clarificación y embotellado se verifican bajo control cuidadoso mediante ensayos de laboratorio. Químicos especializados y experimentados catan y analizan los vinos y prescriben los tratamientos para conseguir la estabilidad y la mejor calidad; las prácticas de clarificación de uso común son la filtración, refino, refrigeración y pasterización.

Fabricación del vino.- Sin entrar en detalles, el procedimiento es el siguiente: se estrujan y desgranados los granos de uvas seleccionados y maduros; se tratan con bióxido de azufre o un sulfito, o se pasterizan y se inoculan en un cultivo puro de levadura.

Después de un corto período de fermentación se saca el vino, se coloca en cubas de depósito para que fer-

mente más, se trasiega, se almacena para que madure, se clarifica y se envasa.

Determinación de azúcares reductores en la materia prima.- En la gran variedad de "vitis vinifera" - predominan los azúcares como la glucosa y la fructosa, - en otras variedades las cantidades de sacarosa y otros - azúcares están presentes en pequeñas cantidades. El contenido de azúcares en los granos de la uva es un factor_ muy importante en la determinación del tiempo de cosecha, sin embargo, el 90% de sólidos son azúcares del total de sólidos solubles.

Técnica: preparar una solución estandar de - glucosa al 0.50%, preparar las soluciones de Fehling "A" y "B".

Fehling "A". Pesar 34.639 gramos de sulfato de cobre pentahidratado y disolver en 500 ml. de agua destilada. Fehling "B". Pesar 173 gramos de tartrato de sodio_ y potasio (sal de Rochelle) y 50 g de hidróxido de sodio, disolverlos en 500 ml. de agua destilada.

Procedimiento: 1. Primero hay que estandarizar el reactivo de Soxhlet (partes iguales de Fehling "A" y - "B". Poner 25 ml de reactivo de Soxhlet en un matraz, - agregar 20 ml de solución de azúcar al 0.50% de glucosa;- calentar a ebullición durante 3 minutos, la coloración - azul desaparece, se agregan unas gotas de azul de metileno y titular con una solución de 0.50% de glucosa, hasta_ la desaparición del color azul y la formación de un preci_ pitado rojo ladrillo.

2. Determinación de azúcares reductores en el vino y mosto.— Tomar 50 ml de vino sin alcohol llevarlo a 100 ml en un matraz (donde se determinará que alcohol puede ser usado), agregar 5 ml de solución de acetato de plomo saturado, agregar carbón activado para decolorar el vino, de 0.1 a 0.5 g; no agregar en exceso debido a que puede absorber el azúcar, añadir 2 gotas de ácido acético glacial. Agitar el contenido y dejar reposar 10 min., aferrar con agua destilada. Nota: en caso de vinos dulces tomar 5 ml ó en el mosto 2 ml, pesar 0.4 g de fosfato disódico y oxalato de sodio, por ml de acetato de plomo usado y agregarlo a un matraz. Vaciar el contenido del primer matraz en este último, agitar y filtrar en un embudo que contenga en el papel filtro de carbón activado; aquí el vino ya sale clarificado.

En un matraz erlenmeyer de 100 ml poner 20 ml de vino clarificado más 25 ml de Sixtilet. Calentar a ebullición la mezcla y agitar; desaparecer el color azul, agregar 5 gotas de azul de metileno y titular en caliente con la solución valorada de glucosa, hasta la aparición de un precipitado rojo como punto final.

Cálculos:

$$A = \frac{(V_a - V_b) (0.005) \times 100}{V}$$

En donde:

A = Azúcares reductores mg/100ml de muestra

2. Determinación de azúcares reductores en el vino y mosto.- Tomar 50 ml de vino sin alcohol llevarlo a 100 ml en un matraz (donde se determinará que alcohol puede ser usado), agregar 5 ml de solución de acetato de plomo saturado, agregar carbón activado para decolorar el vino, de 0.1 a 0.5 g; no agregar en exceso debido a que puede absorber el azúcar, añadir 2 gotas de ácido acético glacial. Agitar el contenido y dejar reposar 10 min, aferrar con agua destilada. Nota: en caso de vinos dulces tomar 5 ml ó en el mosto 2 ml, pesar 0.4 g de fosfato disódico y oxalato de sodio, por ml de acetato de plomo usado y agregarlo a un matraz. Vaciar el contenido del primer matraz en este último, agitar y filtrar en un embudo que contenga en el papel filtro de carbón activado; aquí el vino ya sale clarificado.

En un matraz erlenmeyer de 100 ml poner 20 ml de vino clarificado más 25 ml de Soxhlet. Calentar a ebullición la mezcla y agitar; desaparecer el color azul, agregar 5 gotas de azul de metileno y titular en caliente con la solución valorada de glucosa, hasta la aparición de un precipitado rojo como punto final.

Cálculos:

$$A = \frac{(V_a - V_b) (0.005) \times 100}{V}$$

En donde:

A = Azúcares reductores mg/100ml de muestra

Va = Volumen de glucosa al 0.5% usada para la valoración del Soxhlet.

Vb = Volumen de glucosa al 0.5% usada para la titulación de vino.

V = Volumen del vino en la parte alicuota final.

Determinación de acidez titulable.

Es necesario conocer la acidez total en los productos intermedios y finales obtenidos de la fermentación del vino (mosto y vino), para así poder determinar la cantidad adecuada de dióxido de azufre, que debe agregarse y decidir sobre la corrección correspondiente de la acidez.

La acidez titulable se utiliza durante el procedimiento y operaciones finales para estandarizar el vino y conseguir un cambio favorable. Los ácidos presentes en el mosto y vinos son como ácido tartárico, maléico, láctico, succínico y acético; estos ácidos son orgánicos débiles por lo tanto, se pueden titular con una base fuerte como la sosa, utilizando fenolftaleína como indicador.

Técnica: poner 200 ml. de agua destilada a hervir en un matraz erlemmeyer de 500 ml., agregar a continuación sosa 0.1 N hasta obtener el punto final color rosa pálido; agregar 10 ml. de mosto dentro del matraz y titular hasta tener el mismo color.

Cálculos:

$$\text{Acido tartárico g/100 ml} = \frac{V \times N \times \text{Meq.} \times 100}{\text{alícuota}}$$

V = volumen de NaOH

N = normalidad de NaOH

Meq = miliequivalentes del ácido tartárico.

Determinación de alcoholes destilados como etanol.

Para determinar el alcohol principal obtenido por vías de fermentación del mosto por levadura, se utilizan varios métodos.

Técnica: se destila el alcohol ya sea del mosto ó del vino, para lo cual se efectúa una destilación simple; y obtenido el destilado se pueden utilizar diferentes métodos.

1. Determinación con hidrómetro.- Estos hidrómetros son especiales, los cuales se calibran directamente en % V/V de etanol; además, los hidrómetros son calibrados a 15°C; si la temperatura es diferente a la mencionada en la calibración se hace la corrección por medio de tablas.

2. Determinación con picnómetro. Este método - es considerado como un patrón internacional, es empleado en comparación final y es también el método aprobado por A.O.A.C.

El peso de cierto volumen de muestra de un destilado de alcohol, es comparado con el peso de un volumen exacto de agua destilada.

La división de los pesos de las dos soluciones dan la densidad del destilado y de estos valores se puede calcular el alcohol como % de contenido de alcohol.

Para esta determinación se emplea un picnómetro y una balanza analítica.

3. Índice de refracción. El contenido de etanol del destilado puede estimarse midiendo el índice de refracción; para ello se emplea un refractómetro.

Nitrógeno total.- Los vinos y el mosto presentan gran cantidad de componentes que contienen nitrógeno como son amoníaco, aminoácidos, proteínas, vitaminas, amidas y nitratos.

El nitrógeno es un componente muy importante -

porque se puede determinar el crecimiento de las levaduras y se puede utilizar como factor limitante; también la presencia de los componentes de nitrógeno puede ser factor de descomposición; con esta determinación se puede saber ó determinar la historia del vino y del mosto.

La técnica utiliza el método de Kjeldahl.

Bebidas: vinos

Exámen físico-procedimiento.

Se anota lo siguiente:

- (a) ya sea que el recipiente sea "botella llena"
- (b) la apariencia del vino, ya sea brillante o turbia y - la presencia de sedimento;
- (c) condición cuando abierto, ya sea aun gaseoso, o carbo natado;
- (d) el color y la intensidad del color;
- (e) olor, ya sea vinoso, extraño o acetoso;
- (f) el sabor, ya sea seco, dulce, vinoso, extraño o acetoso.

1.- Preparación de muestra (método oficial)

Se elimina cualquier gas de la muestra, se filtra el vino, haciendo caso omiso de la apariencia. Se determinan inmediatamente la gravedad específica y aquellos ingredientes que estan sujetos a cambio, tales como el alcohol, los azúcares y ácidos.

2.- Gravedad específica (método oficial)

La densidad 20/20° se determina por medio de -

un pequeño picnómetro verificado exactamente.

3.- Determinación de alcohol (método oficial)

Se miden 100 ml de muestra en un matraz de destilación de 300 a 500 ml, anotando la temperatura y se agregan 50 de agua. Se le conecta al refrigerante en posición vertical y se procede a destilar aproximadamente 100 ml. El destilado se diluye exactamente a 100 ml y se lleva a la temperatura inicial. Se determina por medio de un picnómetro.

1ero. Se pesa el picnómetro con agua pura.

2do. Se pesa el picnómetro con el destilado.

Esta operación se recomienda que se haga en tres porciones de destilado y se calcula el % de alcohol Vol/Vol.

Existen otros métodos que también se consideran como oficiales y se usan con un refractómetro de inmersión o el tubo de Etienne.

4.- Determinación de glicerol en vinos secos (método oficial).

(a) por pesada directa.- Se evaporan 100 ml de muestra hasta 10 ml aproximadamente en cápsula de porcelana con un baño de agua (baño maría). El residuo se trata con 5 g de arena fina y de 4 a 5 ml de lechada de cal

(conteniendo 15 g de $\text{CaO}/100 \text{ ml}$) por cada g presente y - se evapora casi hasta sequedad. El residuo húmedo se trata con 50 ml de alcohol de 90 % V/V. La mezcla se calienta en baño de agua (baño maría) agitando constantemente - hasta ebullición. El líquido se decanta a través de papel filtro a un pequeño frasco. El residuo se lava varias veces por decantación con porciones de 10 ml de alcohol caliente hasta filtrar 150 ml totales. Se evapora el filtrado a consistencia de jarabe en cápsula de porcelana, el residuo se transfiere a un vaso pequeño y se adicionan 20 ml de alcohol absoluto y tres porciones de 10 ml de éter anhidro agitando vigorosamente después de cada adición.

Se suspende hasta que la solución se aclare, - se vacía a través del filtro y se lava el cilindro, se filtra con la mezcla de dos partes de alcohol absoluto - por 3 partes de éter anhidro.

El filtrado se evapora a consistencia de jarabe, se seca 1 hora, entre 98 y 100°C, se pesa, se incinera y se vuelve a pesar.

Pérdida en la solución = peso de glicerol.

(b) Determinación por oxidación de dicromato. - Se evaporan 100 ml de muestra hasta 10 ml aproximadamente, en una cápsula de porcelana en baño maría, manteniendo la temperatura entre 85 y 90°C. El residuo se trata con 5 g de arena fina y de 4 a 5 ml de lechada de cal (conteniendo 15 g de $\text{CaO}/100 \text{ ml}$). Se evapora a 5 ml aproximadamente y se trata el residuo con 45 ml de Et-OH absoluto, adicio

nando lentamente, se calienta para disolver sobre baño maría y se transfiere a un vaso y se centrifuga. Se decanta el líquido claro sobre una cápsula de porcelana. El residuo se lava con alcohol caliente hasta obtener un vol. de 150 ml. Se evapora hasta consistencia de jarabe. Se agregan 10 ml de Et-OH absoluto para disolver el residuo y se transfiere cuantitativamente a un matraz tapado con tapa. Se adicionan 3 porciones de 10 ml de eter anhidro agitando fuertemente hasta que desaparezca la suspensión. Se deja asentar hasta que se aclare, se vacía a través del filtro y se lava el cilindro y se filtra con la mezcla de 2 vol. de alcohol absoluto y 3 de éter anhidro. Si se forma precipitado denso en el cilindro, se centrifuga a baja velocidad, se decanta el líquido claro y se lava con tres porciones de 20 ml de la mezcla alcohol-éter, agitando vigorosamente la mezcla cada vez y separando el precipitado por centrifugación, se lava el papel con la mezcla alcohol-éter y se evapora, se filtra y se lava en baño de agua aproximadamente 5 ml; se agregan 20 ml de agua y de nuevo se evapora a 5 ml; de nuevo se agregan 20 ml de agua y se evapora a 5 ml; finalmente se agregan 10 ml de agua y se evapora a 5 ml. Estas evaporaciones son necesarias para quitar el éter y el alcohol, cuando se llevan de 85° a 90°C resultan sin pérdida de glicerol si la concentración de este último es menos de 50 %.

Se transfiere el residuo con agua caliente a un matraz volumétrico de 50 ml, se enfría, se agrega Ag_2CO_3 preparado de 0.1 g de Ag_2SO_4 , se agita y se deja asentar 10 min.

Se agregan 0.5 ml de solución de acetato de plomo básica.

(a); se agita ocasionalmente, y se deja asentar 10 min, se afora, se agita bien, y se filtra, se desecha la primera porción de filtrado. Con la pipeta se colocan 25 ml del filtrado claro en el matraz volumétrico de 250 ml.

Se agrega 1 ml de H_2SO_4 al Pb precipitado en exceso y luego 30 ml de la solución concentrada $K_2Cr_2O_7$. Se agregan cuidadosamente 24 ml de H_2SO_4 agitando suavemente el matraz para mezclar los contenidos y evitar una ebullición violenta y luego se coloca en baño maría hirviendo 20 minutos exactamente. Se quita el matraz del baño, se diluye, se enfría, se diluye y se afora a temperatura ambiente, usando suficiente solución de $K_2Cr_2O_7$ para dejar un exceso de aproximadamente 12.5 ml al final de la oxidación (la cantidad dada arriba de 30 ml, es suficiente para vinagre ordinario que contenga 0.35 g o menos de glicerol/100 ml).

La solución de $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ se valora tomando 20 ml con una pipeta y poniéndolos en un matraz de 250 ml, agregando luego 20 ml de retardador, 4 gotas del indicador y aproximadamente 100 ml de agua. Se titula con la solución diluida de $K_2Cr_2O_7$ hasta que el líquido adquiera un color verde oscuro; gota a gota lentamente hasta que el color cambie de azul-gris a violeta oscuro. Los ml usados

de $K_2Cr_2O_7$ se designan como a.

En lugar de la solución de $K_2Cr_2O_7$ se sustituye la bureta que contiene glicerol oxidado y el exceso de la solución de $K_2Cr_2O_7$ concentrado y se titulan 20 ml de la solución de $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$, se designan los ml usados como b.

Los cálculos de glicerol se obtienen por la siguiente fórmula:

$$G = D - (250a/20b) 0.02, \text{ donde}$$

G = g de glicerol/100 ml de vinagre, y D = solución de $K_2Cr_2O_7$ concentrado usada para oxidar el glicerol.

5.- Determinación de sólidos no-dulces

(extracto libre de azúcares) método oficial

6.- Azúcares reductores en vinos secos.-

Colocar 200 ml de la muestra en una cápsula de porcelana y neutralizar con NaOH exactamente valorada, y evaporar a aproximadamente 50 ml, transferir a un matraz volumétrico de 200 ml y adicionar suficiente solución de acetato de plomo hasta clarificar la solución, diluir al aforo y agitar, y filtrar con papel. Para eliminar el exceso de plomo se precipita éste con acetato de potasio y en la solución resultante se determinan los azúcares por el método de Fehling ó utilizando un polarímetro.

7.- Determinación de sacarosa.

Se sigue el método anterior y se determina por medio de un polarímetro.

8.- Determinación de cenizas.

Se colocan de 5 a 10 g de la muestra en una cápsula de platino y se evapora a 110°C. Una vez seca la muestra, se calcina a 525°C hasta peso constante.

9.- Determinación de alcalinidad de las cenizas.

Las cenizas obtenidas del proceso anterior se tratan con 10 ml de H_2SO_4 0.1 N y el exceso de H_2SO_4 se titula con NaOH 0.1 N. La alcalinidad se expresa como ml. de H_2SO_4 0.1 N requeridos para neutralizar las cenizas producidas por 100 g de muestra.

10.- Determinación de fósforo.

Método oficial

Método colorimétrico

(a) reactivo de molibdato.- Se disuelven 25 g de molibdato de amonio en 500 ml de H_2O , se agregan 140 ml de H_2SO_4 y se diluyen a 1 litro con H_2O .

(b) solución de bisulfito de sodio.- Se disuelven 150 g de NaHSO_3 en H_2O y se diluyen a 1 lt. con H_2O .- Se mantiene bien tapada y se filtra si se enturbia.

(c) Solución de sulfito de sodio.- Se disuelven 200 g de Na_2SO_3 en H_2O y se diluyen a 1 litro con H_2O . Se mantiene bien tapada y se filtra si se enturbia.

(d) reactivo de ácido sulfónico.- Se disuelven 1.25 g de ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico en 490 ml de la solución de NaHSO_4 y se agita. Se agrega solución de NaHSO_3 en porciones de 5 ml hasta que la solución resulte clara (25 ml). Se revisan las soluciones de fosfato valorada en intervalos semanales.

(e) Solución patrón de fosfato.- Se disuelven 0.439 g de KH_2PO_4 anhidro puro en H_2O y se diluyen con H_2O . 1 ml = 0.1 mg de P ó 0.229 mg de P_2O_5 .

11.- Determinación.

Se toman con la pipeta 10 ml de muestra y se ponen en una cápsula de platino y se evapora a sequedad en el horno a 100° , posteriormente se calcina en mufla a 525° . La ceniza se disuelve en 10 ml de H_2SO_4 0.1 N, se -

pasa a un matraz de 100 ml, se le agregan 50 ml de H_2O , - 10 ml de reactivo de molibdato y 4 ml de reactivo de ácido sulfónico, se determina el P de la curva patrón preparada de 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, y 5.0 ml de solución de - fosfato patrón diluida con H_2O a 65 ml en un matraz de - 100 ml, se procede con la determinación. La temperatura - de la mezcla debe estar a $\pm 3^\circ$ de la temperatura a la - cual se trazó la curva de calibración.

12.- Determinación de cloruros.

A 100 ml de vino seco ó 50 ml de un vino dulce se le agrega suficiente Na_2CO_3 hasta hacer alcalina la solución. Se evapora a sequedad y el residuo se disuelve en HNO_3 (1:4). De esta solución se toman partes alicuotas y se determinan los cloruros por técnicas volumétricas (Argentometría), por precipitación con $AgNO_3$ con potenciometro o bien cualquiera de los métodos ya conocidos.

13.- Preparación de la curva patrón.

Se toman con una pipeta de 0 a 10 ml de la solución de ácido tánico patrón en matraces de 100 ml conteniendo 75 ml de H_2O . Se agregan 5 ml de reactivo de Folin -Denis que se prepara de la siguiente manera: a 750 ml de H_2O se le agregan 100 g de $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$, 20 g de ácido -

fosfomolibdico y 50 ml de H_3PO_4 . Se pone a reflujo 2 hrs., se enfría y se diluye a 1 litro.

Se agregan 10 ml de solución de Na_2CO_3 y se diluye y afora con H_2O . Se mezcla bien y se determina la absorbancia después de 30 minutos a 760 $m\mu$. Se grafica la absorbancia contra mg de ácido tánico/100 ml.

14.- Acidez volátil total.

(a) se calientan rápidamente a ebullición 50 ml de muestra en un matraz de destilación de 500 ml, conectado al condensador y al paso de vapor hasta obtener 15 ml de destilado que requieren sólo dos gotas de NaOH 0.1 N para su neutralización. Se hierve agua para generar vapor varios minutos, para expulsar el CO_2 antes de conectar el generador con el matraz de destilación. Se titula rápidamente con NaOH 0.1 N, usando fenolftaleína como indicador, (el color debe persistir 10 seg.) Se expresa como ácido acético: 1 ml de NaOH 0.1 N = 0.0060 g de ácido acético.

(b) Se introducen 10 ml de muestra, libres de CO_2 , vaciando vasos grandes en tubos del aparato de destilación tipo Horvet; (ver fig.). Se colocan 150 ml de agua recién hervida en el matraz exterior. Se conecta con el tubo condensador y se destila, calentando el matraz externamente, en un matraz Erlenmeyer de 300 ml, marcado a 80 ml, se recogen 80 ml de destilado: Si el vino es nuevo o

se carga con CO_2 , el destilado se lleva a ebullición, se hierve 30 seg y se titula en caliente, con NaOH 0.1 N, usando fenolftaleína como indicador. Como alternativa, se ajusta el flujo de agua a través del condensador de tal manera que el condensado se reciba caliente. Se destila a una velocidad tal, que se obtengan los 80 ml en 10 min. Para los vinos con contenido de ácido acético anormalmente alto, se continúa la destilación y titulación cada 10 ml de destilado, hasta no más de una gota de alcali 0.1 N que es lo que se requiere para alcanzar la neutralización. Si el vino no tiene CO_2 ó se le ha eliminado previamente el CO_2 calentándose a ebullición y luego enfriándose, o agitándose en vacío en un matraz conectado a un aspirador de H_2O , el destilado puede titularse en frío. Se usa una bureta de 10 ml con graduaciones de 0.05 a 0.02 ml.

15.- Acidez volátil exclusiva de SO_2 .

Se toman 50 ml de muestra con la pipeta y se colocan en un matraz de 100 ml. Si es blanco se agregan 2 o 3 gotas de fenolftaleína como indicador y se neutraliza hasta el color rosa con solución de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ saturada, clara; si es tinto, se agrega suficiente solución de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ para llevar la mezcla a un pH de 8, usando fenolftaleína como indicador extremo. Se deja asentar la mezcla 30 minutos y se mantiene en el punto final de la fenolftaleína agregando más $\text{Ba}(\text{OH})_2$ si es necesario. Se diluye a 100 ml, se mezcla y se filtra rápidamente con papel de filtración rápida (Whatman No. 2). Se toman 20 ml de filtrado con la pipeta y se ponen en tubo de Sellier o de -

Horvet, se usa el tubo de tipo más grande y se agrega 1 ml de H_2SO_4 (1 a 3), se adicionan 15 ml de H_2O recién hervida en una matraz externo y se destilan 100 ml. Se titula con $NaOH$ 0.1 N, usando fenolftaleína como indicador.

16.- Acido sulfuroso - Oficial

Se usan de 100 a 300 ml de muestra que no contenga más que 40 mg de SO_2 . Se limpia el matraz con CO_2 ó N_2 , se para el flujo de gas y se agrega la muestra al matraz goteando el embudo. Se agrega suficiente S libre de H_2O hasta hacer un volumen total de 300 ml, luego se agregan 20 ml de HCl . Se deja la mezcla asentar pocos minutos hasta que deja de humear. Se ajusta el quemador, de tal forma que los vapores no se eleven más de 1/10 de la longitud de la chaqueta de agua del condensador y se hierve la mezcla 90 minutos. Se ajusta el flujo de gas, de tal manera que sea lento pero estacionario el vapor que pase a través del recipiente durante la destilación. Los resultados se informan como mg de SO_2/l (como el SO_2 en el vino es inestable, la muestra debe darse sin tratamiento preparatorio de desgaseamiento y la exposición al aire debe ser mínima antes de la determinación).

17.- Acidez fija - oficial

La acidez se calcula multiplicando la acidez volátil por 1.25 para tartárico 1.12 para málico ó 1.17 para ácido cítrico (hidrato) y se resta el producto de la acidez total.

18.- Acido tartárico - oficial.

Se neutralizan 100 ml de muestra con NaOH, calculando de la acidez, el número de álcali normal necesario. Si se agregan más de 10 ml de álcali, se evapora a 100 ml. Para neutralizar la solución se agregan 0.075 g de ácido tartárico por cada ml que se agrega de álcali. Es esencial que el ácido tartárico sea puro, se recristaliza si es necesario. Después de que se disuelve el ácido tartárico, se agregan 2 ml de ácido acético y 15 g de KCl. Después de que se disuelve el KCl se agregan 15 ml de alcohol, se agita vigorosamente hasta que el $\text{KHC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ comienza a precipitar y se mantiene en hielo entre 15° y 18°C por lo menos 15 horas. Se decanta en un gooch preparado con una capa muy delgada de asbesto, o en un papel filtro en un embudo Buchner. El precipitado del vaso se lava por filtrado (se mantiene frío), finalmente se limpia el vaso y se filtra 3 veces con pocos ml de mezcla de 15 g de KCl, 20 ml de alcohol y 100 ml de H_2O , usando no más de 20 ml para lavar toda la solución. Se transfiere el asbesto ó papel y el precipitado al vaso en el cual fué hecha la precipitación, el gooch o Buchner se lava con agua caliente usando aproximadamente 50 ml en total, se calienta a ebullición y se titula la solución en caliente con NaOH 0.1 N, usando indicador de fenolftaleína. Se aumenta el número de mililitros de álcali 0.1 N requeridos por 1.5 ml para dejar para la solubilidad del precipitado. Bajo estas condiciones 1 ml de álcali 0.1 N = 0.015 g de ácido tartárico. Para obtener g totales de ácido tartárico/100 ml de vino se resta la cantidad de ácido tartárico agregado de este resultado.

19.- Acido láctico - oficial

Se transfieren 25 ml de muestra a un matraz de 250 ml, se agregan aproximadamente 25 ml de H_2O y 100 ml de alcohol, se agita vigorosamente. Se diluye y afora con alcohol y se filtra a través del papel doblado. Se transfieren 200 ml de filtrado a un vaso de 400 ml y se evapora a 25 ml. Se agregan 50 ml de H_2O y se evapora de nuevo a 25 ml. Se transfiere el material al extractor continuo_ con 25 ml de H_2O .

20.- Caramelo (prueba de Mathers) -oficial

Reactivos

(a) Solución de pectina. Se disuelve 1 g de pectina en 75 ml de H_2O , se agregan 25 ml de alcohol para la preservación, se agita bien antes de usarse.

(b) Solución de 2,4-Dinitrofenilhidrazina. Se disuelve 1 g de 2,4-Dinitrofenilhidrazina en 7.5 ml de H_2SO_4 y se diluye a 75 ml con alcohol. (Si se guarda la solución en una botella de vidrio tapada, permanecerá clara y estable varios meses).

21.- Prueba preliminar.

19.- Acido láctico - oficial

Se transfieren 25 ml de muestra a un matraz de 250 ml, se agregan aproximadamente 25 ml de H_2O y 100 ml de alcohol, se agita vigorosamente. Se diluye y afora con alcohol y se filtra a través del papel doblado. Se transfieren 200 ml de filtrado a un vaso de 400 ml y se evapora a 25 ml. Se agregan 50 ml de H_2O y se evapora de nuevo a 25 ml. Se transfiere el material al extractor continuo con 25 ml de H_2O .

20.- Caramelo (prueba de Mathers) -oficial

Reactivos

(a) Solución de pectina. Se disuelve 1 g de pectina en 75 ml de H_2O , se agregan 25 ml de alcohol para la preservación, se agita bien antes de usarse.

(b) Solución de 2,4-Dinitrofenilhidrazina. Se disuelve 1 g de 2,4-Dinitrofenilhidrazina en 7.5 ml de H_2SO_4 y se diluye a 75 ml con alcohol. (Si se guarda la solución en una botella de vidrio tapada, permanecerá clara y estable varios meses).

21.- Prueba preliminar.

Se colocan 10 ml de muestra en una botella de plástico ó en otro tubo centrifugo. Se agrega de 3 a 5 gotas de HCl y se mezcla; se llena la botella con alcohol (aproximadamente 50 ml), se mezcla, se centrifuga y se decanta. Se disuelve el precipitado en 10 ml de H₂O y se agrega HCl y alcohol como la anterior; se agita bien, se centrifuga y se decanta. Se repite la operación hasta que el líquido alcalino este incoloro. Por último, se disuelve el residuo gelatinoso en 10 ml de H₂O caliente. Si la solución es incolora, el caramelo está ausente; si la solución es café claro, indica caramelo. Se confirma como sigue: se agrega 1 ml de solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina, se mezcla y se calienta en agua hirviendo. Si hay caramelo, se forma el precipitado.

22.- Prueba confirmatoria.

Se colocan 10 ml de muestra en una botella centrifuga o tubo, se neutraliza con solución de KOH al 2%. Se agita vigorosamente y se centrifuga de 5 a 10 ml. Se decanta el líquido que sobrenada cuidadosamente del residuo y se agrega agua caliente ó hirviendo. El proceso se repite hasta que la capa acuosa superior está completamente incolora y clara. Se usa cualquier cantidad de agua caliente. Al residuo bien lavado se le agregan 50 ml o más de alcohol al 85% conteniendo 0.5 % de HCl y se centrifuga de nuevo, se decanta el líquido superior de cualquier residuo que permanezca. (El caramelo se ve como una capa delgada café en el fondo de la botella). Se agrega otra porción de alcohol al 85% conteniendo HCl al 0.5% y se centrifuga de nuevo. El proceso se repite hasta que el lí

quido que sobrenada está completamente claro e incoloro.

Para facilitar el lavado, se sumerge la bote -
lla y el contenido, unos minutos en un vaso con agua hir-
viendo. Después del lavado final y la decantación, el re-
siduo se disuelve en 10 ml de H_2O . Si la solución es ca-
fé claro, el caramelo puede estar presente, pero su pre-
sencia se debe confirmar con 2,4-dinitrofenilhidrazina co
mo en el caso anterior.

4. TABLAS

TABLA I. Absorción de Clardina-3,5-diglucoído como una función de la acidez de la mezcla.

pH	$\lambda_{1, nm}$	E_1	$\lambda_{2, nm}$	E_2
2.4	510	12000	278	17000
2.9	510	6000	278	17000
3.9	510	1000	278	18000
4.9		0	278	18000

TABLA II. Pigmentos de la Figura 1

	Aplicaciones				
	Delfi- nidina	Petu- nidina	Malvi- dina	Clard- dina	Peard- na
Diglucoído	1	2	3	4	5
Diglucoído acilado	6	7	8	9	10
Monoglucoído	11	12	13	14	15
Monoglucoído acilado (1)	16	17	18	19	20
Monoglucoído acilado (2)			18'		20'

TAQA III. Distribución de Antocianinas a través de las diferentes especies del Género *Vitis*

Pigmentos de Antocianina	No. lugar figura 1	Especies de <i>Vitis</i>						Especies de <i>Vitis</i>								
		robyn difo- lie	ripa rie	ripus tris	labrus ca	arizonica	berlingieri	monticola	cordifolia	na- bra	lin- concu- sil	ses- tiva- lie	cori- ces	su- res- ste	vinifera (a) (b)	
Total		5	15	12	11	11	10	6	11	12	17	9	7	5	5	9
de cada pigmento:																
Cianidina																
monoglucósido	14		2		5	8	8	3	10	20	29	31	58		20	3
monoglu., acilado	19										7					
diglucósido	4	9	5	2		1				1	2	3	4			
diglu., acilado	9										5					
Pteridina																
monoglucósido	15				10	14	16	5	11	5	7	11	6	13	45	15
monoglu., acilado ^b	20				3	1	1			1						2
monoglu., acilado ^b	20 ^a															2
diglucósido	5	6	2	8	1	10	2	2	1	3	4	4	15			
diglu., acilado	10										2		4			
Delfiridina																
monoglucósido	11		14	9	21	13	23	36	15	30	17	31	20		6	12
monoglu., acilado	16		1	3							6					
diglucósido	1	38	12	34						1	1					
diglu., acilado	6		2	6							3					
Peturidina																
monoglucósido	12		10	3	15	10	20	26	18	20	8	10	4	5	9	12
monoglu., acilado	17		1													
diglucósido	2	29	17	22	1	1	1		2	2	1					
diglu., acilado	7		3	2							3					
Malvidina																
monoglucósido	13		6	2	34	29	25	27	30	16	4	6		27	20	36
monoglu., acilado ^b	10		2		7	3	2	3	4			2				9
monoglu., acilado ^b	18 ^a				1				1	1						9
diglucósido	3	18	21	0	2	10	2		5	2	1	2		40		
diglu., acilado	8		2	1					2		1					

^aV. vinifera (a) = Muscat Hamburg, V. vinifera (b) = otras variedades

La diferencia en la estructura de estos dos pigmentos no ha sido explicada.

TABLA IV. Especies del Género *Vitis*

<i>Vitis</i>			
<i>Euvitis plench</i>			
Muscadinia plench.	Americana	Asiática	Europa
<i>V. munsoniana</i> SIMPSON	^a <i>V. Labrusca</i> L.	<i>V. coignetiae</i> PULL	^a <i>V. vitifera</i> L.
^a <i>V. rotundifolia</i> MIDOX	<i>V. californica</i> BENTHAM.	<i>V. thunbergii</i> SIEB.	
	<i>V. caribaea</i> CAND.	<i>V. flexuosa</i> THUNB.	
	<i>V. coriacea</i> SMITH.	<i>V. rotundifolia</i> ROM.	
	^a <i>V. Lincolniana</i> BUCKLEY	<i>V. rotundifolia</i> ROM.	
	<i>V. bicolor</i> LEC.	^a <i>V. vulpina</i> ROM.	
	^a <i>V. aspera</i> MIDOX.	<i>V. rotundifolia</i> ROM.	
	^a <i>V. Berlandieri</i> PLANCH.	<i>V. pedunculata</i> LAM.	
	^a <i>V. cordifolia</i> MIDOX.	<i>Sinovitisa davidii</i> ROM.	
	<i>V. cinerea</i> ENGELM.		
	^a <i>V. rupestris</i> SCH.		
	^a <i>V. monticola</i> BUCKLEY.		
	^a <i>V. Arizonica</i> ENGELM.		
	^a <i>V. riparia</i> MIDOX.		
	^a <i>V. rubra</i> MIDOX.		
	<i>V. californica</i> ENGELM.		

^a Denota aquellas estudiadas.

TABLA V. Antocianinas y Taninos de Vinos Tintos de diferentes cosechas de dos Viñedos de la Región de Burdeos.

Cosecha	Intensidad de color D_{420} $+ D_{520}$	<u>Antocianinas, mg/l.</u>		Total de Taninos, gramos/ litro	V/LA
		Por dife- rencia de pH	Por reac- ción con NaHSO_3		
Viñedo 1					
1921	0.802	19	27	4.40	0.72
1926	0.690	16	20	3.30	0.65
1928	0.710	16	24	3.45	0.50
1929	0.346	20	26	3.05	0.42
1938	0.523	16	20	2.70	0.80
1952	0.607	18	20	2.50	0.98
1956	0.456	23	26	2.15	1.10
1959	0.545	97	93	2.05	1.43
1961	0.540	165	188	1.85	1.35
1962	0.487	305	330	1.50	1.40
Viñedo 2					
1953	0.720	30	42	3.70	0.84
1957	0.520	39	50	2.00	1.21
1960	0.590	60	69	2.25	1.18
1962	0.765	110	122	2.50	1.34
1963	0.359	133	125	2.25	1.70
1964	0.835	362	385	2.25	1.31

TABLA VI. Estructuras de Taninos de diferentes vinos.

	Año	Total de Taninos gramos/ litro	<u>Peso Molecular Medio</u>		Número de unidades de Flave- no
			Primera Determinación	Segunda Determinación	
Vinos	1914	1.7	739 ± 49		2-3
V. vinifera	1952	4.5	3750 ± 600	4000 ± 811	10-14
	1957	2.9	2995 ± 400	3400 ± 600	9-11
	1962	2.5	2010 ± 211	2288 ± 268	6-7
	1966	3.5	2134 ± 303	1909 ± 181	6-8
	1967	2.9	2200 ± 230		6-8
	1968	1.9	1071 ± 58		3-4
	1969	2.0	895 ± 34		3
Vinos	1967	1.7	2150 ± 360	2500 ± 350	6-8
Híbridos	1968	1.1	1900 ± 235	1886 ± 189	5-7

TABLA VII. Desarrollo de Antocianinas y Taninos como Frutas Maduras Cabernet-Sauvignon, variedad P, resultados expresados en gramos por 200 - frutas secadas por extracciones en frío y en caliente.

Fecha	Antocianinas	Taninos
25 Agosto 1969	0.02	0.42
1 Septiembre 1969	.11	.70
8 Septiembre 1969	.27	.89
15 Septiembre 1969	.35	.93
22 Septiembre 1969	.37	.95
26 Septiembre 1969	.31	.75

TABLA VIII. Compuestos Fenólicos en la cáscara de la uva en la madurez de cosecha en el variedad SC últimas pruebas antes de cosechar, 1969, 1970, 1971, y 1972.

	Antocianinas, Gramos por <u>200 frutas</u>		Taninos, gramos por <u>200 frutas</u>		<u>Índice de Fenol</u>	
	Extracto frío	total	Extracto frío	total	Extracto frío	total
Merlot						
1969, 22 Sept.	0.20	0.27	0.55	1.09	4.7	10.4
1970, 28 Sept.	0.32	0.41	0.66	1.03	6.0	10.0
1971, 27 Sept.	0.21	0.31	0.90	1.36	6.3	11.1
1972, 9 Oct.	0.21	0.24	0.44	0.77	4.0	7.5
Cabernet						
1969, 29 Sept.	0.22	0.31	0.36	0.86	4.2	9.2
1970, 28 Sept.	0.41	0.55	0.72	1.34	6.7	12.2
1971, 27 Sept.	0.24	0.36	0.57	1.12	5.5	13.2
1972, 16 Oct.	0.24	0.28	0.45	1.09	7.4	15.2

TABLA IX. Compuestos Fenólicos en la cáscara de la uva en la madurez de cosecha en el viñedo P.

Últimas pruebas antes de cosechar, 1969, 1970, 1971, y 1972.

	Antocianinas, gramos por <u>200 frutas</u>		Taninos, gramos por <u>200 frutas</u>		<u>Índice de Fenol</u>	
	Extracto frío	Total	Extracto frío	Total	Extracto Frío	Total
Merlot						
1969, 22 Sept.	0.23	0.30	0.90	0.96	4.6	9.6
1970, 28 Sept.	0.42	0.52	0.62	1.07	6.7	10.9
1971, 27 Sept.	0.32	0.41	0.99	0.96	6.3	11.6
1972, 2 Oct.	0.34	0.40	0.49	0.92	6.9	12.4
Cabernet						
1969, 26 Sept.	0.25	0.31	0.36	0.75	4.6	8.9
1970, 5 Oct.	0.34	0.42	0.53	0.87	5.6	9.2
1971, 27 Sept.	0.23	0.31	0.60	0.97	5.7	10.9
1972, 16 Oct.	0.19	0.20	0.41	0.82	6.4	11.7

TABLA X. Compuestos Fenólicos en la semilla de la uva en la madurez de cosecha en el viñedo SC.

Últimas pruebas antes de cosechar, 1969, 1970, 1971, y 1972.

	Taninos, gramos en <u>200 frutas</u>		<u>Índice de Fenol</u>	
	Extracto frío	Total	Extracto Frío	Total
Merlot				
1969, 22 Sept.	0.04	0.81	0.4	3.1
1970, 28 Sept.	0.02	0.34	0.8	6.0
1971, 27 Sept.	0.08	1.03	1.1	10.1
1972, 9 Oct.	0.04	0.72	0.8	12.1
Cabernet				
1969, 26 Sept.	0.07	0.74	1.1	7.9
1970, 28 Sept.	0.06	0.36	1.2	6.0
1971, 27 Sept.	0.04	0.68	0.8	8.1
1972, 16 Oct.	0.05	0.66	1.1	8.7

TABLA XI. Compuestos Fenólicos en la semilla de la uva en la madurez de cosecha en el viñedo P
últimas pruebas antes de cosechar, 1969, 1970, 1971, y 1972.

	Taninos, gramos en 200 frutas		Índice de Fenol	
	Extracto		Extracto	
	frío	Total	frío	Total
Verlot				
1969, 22 Sept.	0.03	0.78	0.6	8.7
1970, 28 Sept.	0.04	0.32	1.1	6.3
1971, 27 Sept.	0.09	0.55	1.3	7.4
1972, 2 Oct.	0.06	0.76	1.1	14.7
Cacerbet				
1969, 26 Sept.	0.07	0.75	0.6	6.9
1970, 5 Oct.	1.10	0.43	1.4	5.9
1971, 27 Sept.	0.07	0.54	1.2	7.9
1972, 16 Oct.	0.06	0.56	1.0	12.7

TABLA XII. Influencia de las células de Levadura sobre los Compuestos Fenólicos contenidos en un medio sintético.

	Tinte	Intensidad de color	Anto- cianinas g/l	Taninos g/l
Control				
1er. día	0.46	0.41		
17avo. día	0.50	0.43	0.19	0.7
Control + Levadura				
1er. día	0.46	0.14		
17avo. día	0.60	0.13	0.05	0.2

TABLA XIII. Influencia de los Tallos sobre los Compuestos Fenólicos.
Contenido de un medio sintético.

	Tinte	Intensidad de color	Antocia- ninas g/l	Taninos, g/l
Control				
1er. día	0.46	0.41		
17avo. día	0.50	0.43	0.19	0.7
+ Extracto de Tallo				
1er. día	0.55	0.62		
17avo. día	0.64	0.59	0.17	6.8
+ Tallos				
1er. día	0.98	0.33		
17avo. día	1.66	0.20	0.03	4.0

TABLA XIV. Cambio en la concentración de Compuesto Fenólicos en -
función del Tiempo de contacto oscura-jugo

Duración de contacto oscura- jugo, días	Tinte	Intensidad de color	Anto- cianinas gramos/ litro	Taninos gramos/ litro	V/LA	Índice de Perman- genato
1	0.78	0.46	0.19	0.75	1.2	18
2	0.56	0.89	0.46	1.77	1.3	30
3	0.56	1.24	0.50	1.96	1.4	37
4	0.52	1.52	0.63	2.42	1.6	45
6	0.53	1.43	0.67	2.63	1.9	48
8	0.56	1.62	0.61	3.18	1.8	50
10	0.52	1.41	0.61	3.39	1.9	60
14	0.51	1.36	0.59	3.95	1.9	62
20	0.59	1.21	0.48	3.66	1.9	62
30	0.67	1.20	0.39	3.74	2.0	67
40	0.67	1.22	0.38	4.26	2.1	70
50	0.71	1.23	0.37	4.30	2.2	72

TABLA XV. Coloración de soluciones modelo de Antocianina y Tanino, resultados analíticos.

Condiciones ^a	Color		Antocianinas, mg/lit	Índice Total de Fenoles	Taninos, gramos/ litro	Índice de Condensa- ción de Tanino, V/LA
	Tinte	Intensidad				
1. A f ⁺ o ⁺	0.44	0.15	390	5	0	
2. T f ⁺ o ⁺	1.92	0.90	25	95	4.4	2.5
3. M f ⁺ o ⁺	1.96	0.74	60	62	4.8	2.4
4. A f ⁺ o ⁻	0.32	0.15	375	6	0.2	
5. T f ⁺ o ⁻	1.94	0.21	20	65	5.1	3.2
6. M f ⁺ o ⁻	0.96	0.36	135	70	5.5	3.0
7. A f ⁻ o ⁺	0.31	0.15	365	6	0.2	
8. T f ⁻ o ⁺	2.03	0.29	20	60	4.5	3.4
9. M f ⁻ o ⁺	1.65	0.51	70	70	5.4	2.6
10. A f ⁻ o ⁻	0.27	0.15	375	6	0.2	
11. T f ⁻ o ⁻	1.95	0.19	10	62	5.2	3.1
12. M f ⁻ o ⁻	0.93	0.34	135	68	5.2	2.9

^aA = Antocianinas; T = Taninos; M = Antocianinas + Taninos; f⁺ y f⁻ = presencia y ausencia de Fe³⁺; o⁺ y o⁻ = presencia y ausencia de Oxígeno del aire.

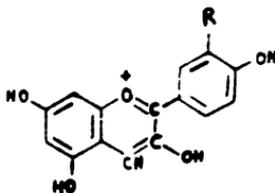
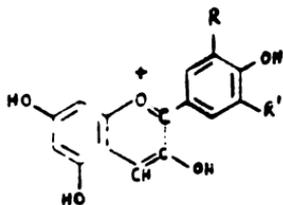
TABLA XVI. Influencia del tipo y tamaño de contenedor sobre los vinos de color

	<u>Color</u>		Anto- cianinas, gramos/ litro	Taninos, Gramos/ litro
	Tinte	Intensidad		
Primer experimento ^a				
Vino guardado en 225-l madera nueva	0.76	0.67	0.14	2.7
Vino guardado en 225-l madera usada	0.72	0.64	0.12	2.3
Vino guardado en 100-l tanque de acero inoxidable	0.67	0.52	0.17	2.7
Segundo experimento ^b				
Vino guardado en 300-hl tanque	0.72	0.41	0.12	3.0
Vino guardado en 300-hl tanque	0.73	0.40	0.12	3.2
Vino guardado en 300-hl tanque	0.70	0.39	0.15	3.2
Vino guardado en 225-l madera	0.70	0.50	0.16	3.1

^aVino cosecha de 1966, analizado en Enero de 1970.

^bVino cosecha de 1969, analizado en Mayo de 1970.

5. FORMULAS



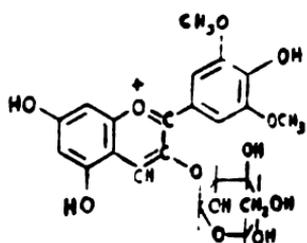
1 $R = R' = OH$; delphinidina

2 $R = OCH_3$; $R' = OH$; petunidina

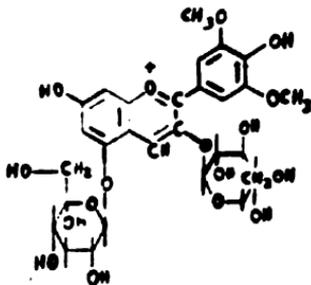
3 $R = R' = OCH_3$; malvidina

4 $R = OH$; cianidina

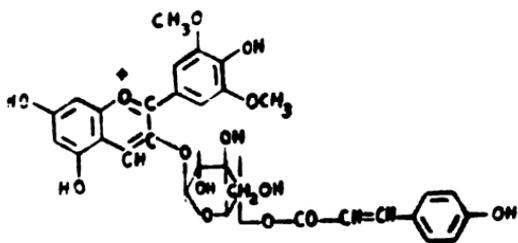
5 $R = OCH_3$; peonidina



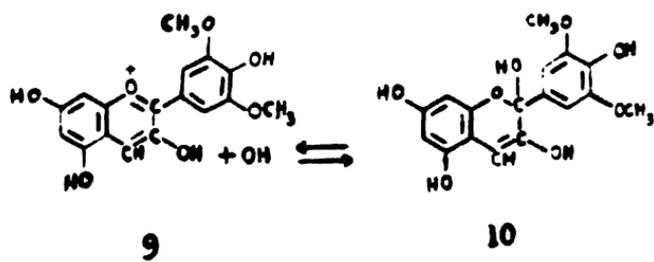
6 Malvidin-3-monoglucoside

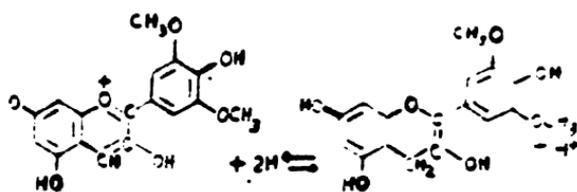


7 Melvidin-3,5-diglucoside



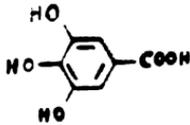
2 (p-cumaril-4-glucosido)-3-malvidina





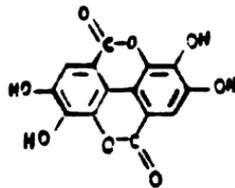
13

14



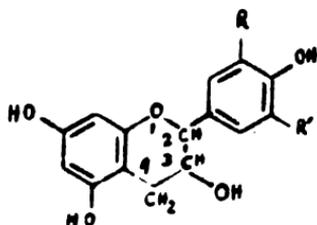
15

Acido gálico



16

Acido elágico



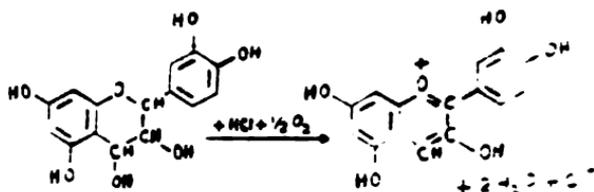
3-FLAVANOLS (catechins)

- 17 R = R' = H; epicatechins
 18 R = OH, R' = H; catechins
 19 R = R' = OH; galocatechins

↓

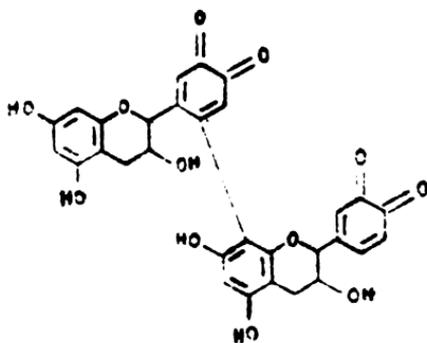
3,4-FLAVANOLIDES (leucoantocyanidins)

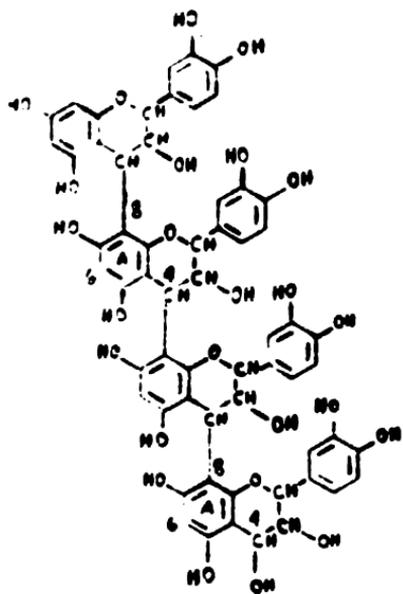
- 20 R = R' = H; leucopelargonidins
 21 R = OH, R' = H; leucocyanidins
 22 R = R' = OH; leucodelphinidins



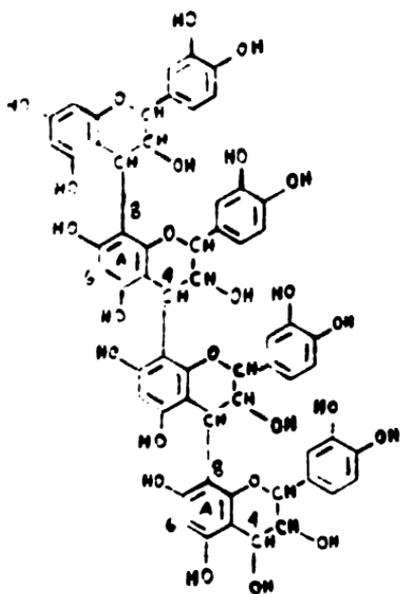
23 Leucocianidina

24 Cianidina

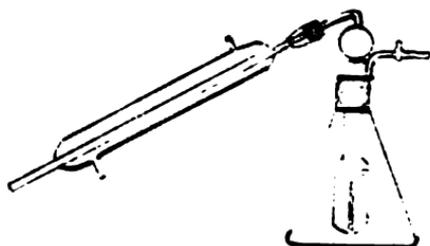




34 flavoleno (tetramero)



34 flavolano (tetramero)

6. FIGURAS**APARATO PARA LA DETERMINACION DE LA ACIDIZ VOLATIL**

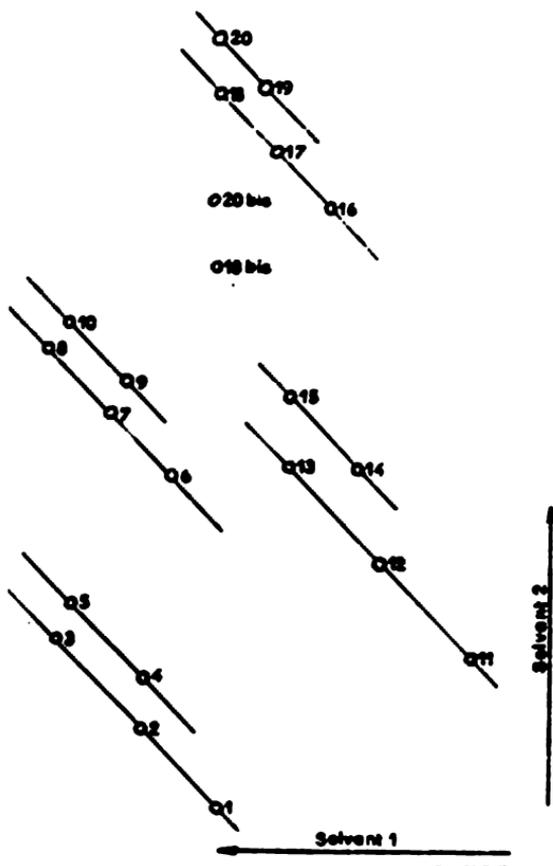
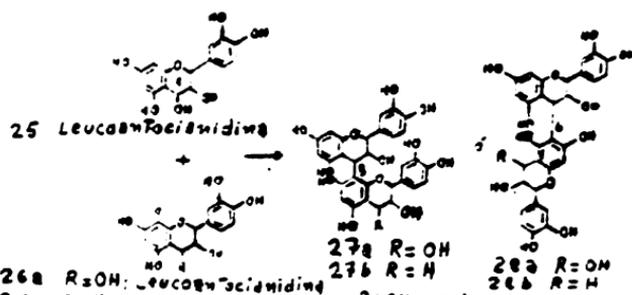


Figura 1. Cromatograma esquemático en dos dimensiones de las antocianinas de uva (1)



26a R=OH; Leucoantocianidina
26b R=H; Catecol

R=OH, la condensación continúa para formar un Flavono con 3 unidades
R=H; la condensación se detiene en el caso de dímero (proantocianidina).

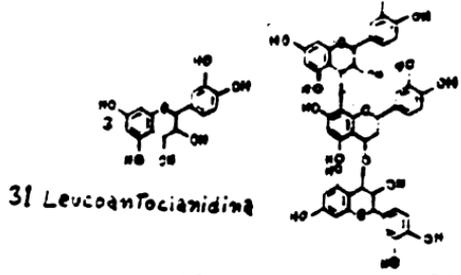
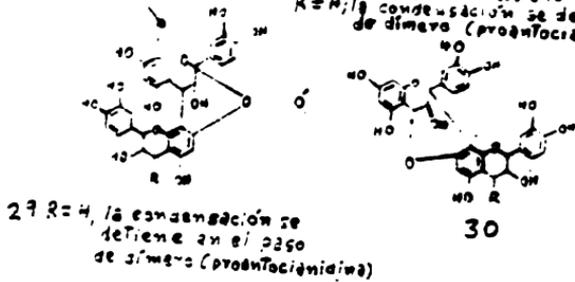


Figura 2. Condensación de moléculas de flavono elementales para la formación de proantocianidinas (de 3 a tres moléculas elementales) y de flavonoides (de tres a 10 moléculas elementales); los 3 números son los constituyentes de los términos condensados.

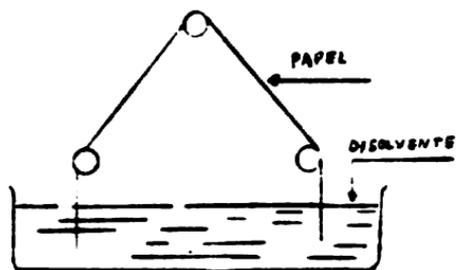


Figura 3. Dispositivo para separar las antocianinas de vino tinto en papel para detectar los vinos de uvas híbridas

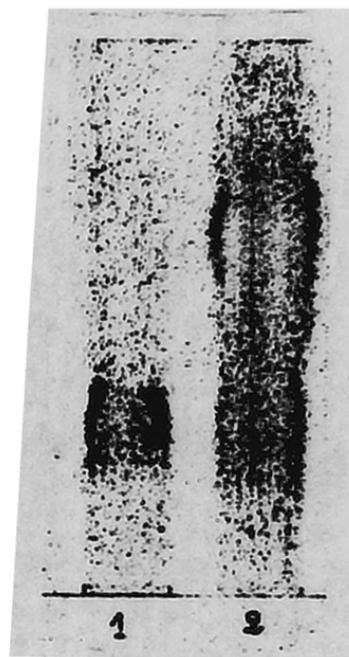
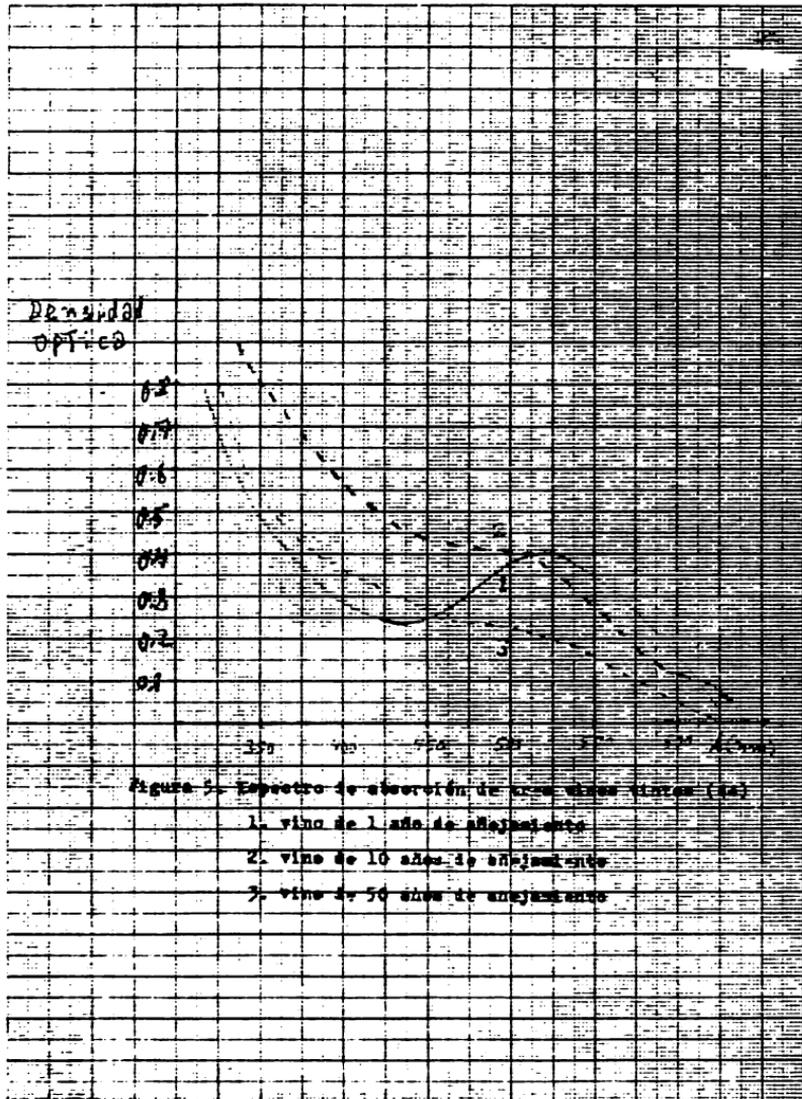


Figura 4. Diferenciación de vinos de acuerdo a sus antocianinas; 1 es *V. vinifera*, 2 es la mayoría de los híbridos



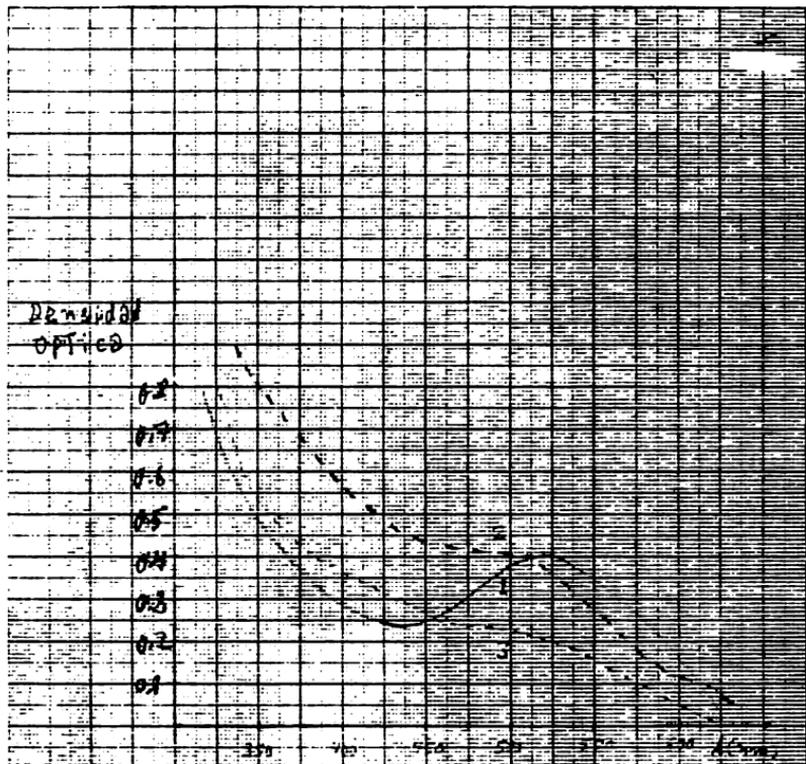


Figura 5.- Espectro de absorción de tres vinos típicos (ca)

1. vino de 1 año de envejecimiento
2. vino de 10 años de envejecimiento
3. vino de 50 años de envejecimiento

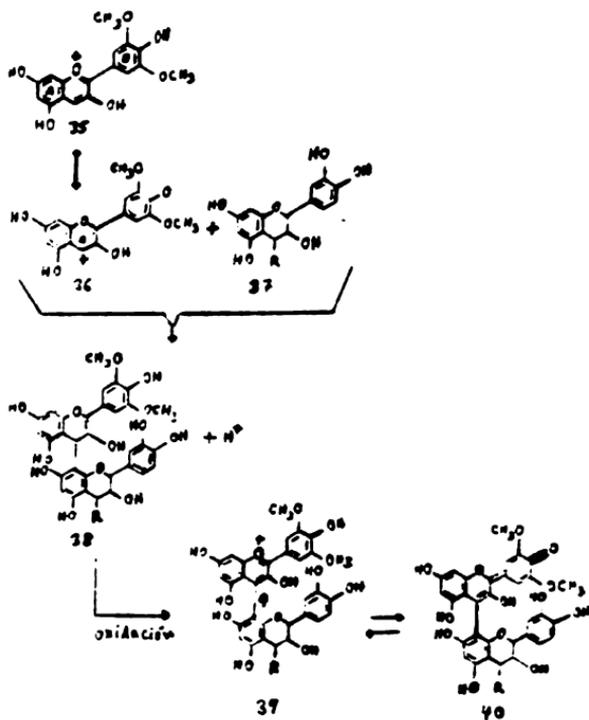


Figura 7. Condensación de antocianinas con flavanos. El tinte obtenido es tinto, pero como la posición 4 de la antocianina - está ausente, no reacciona con clorhidrato y su color no varía con los cambios de pH.

7.- CONCLUSIONES

- 1.- Las propiedades de los vinos tintos dependen de las especies de uva de la cual estan hechos, así como del terreno en el cual se cultivaron las uvas, fertilizantes e insecticidas empleados, tiempo de cosecha, etc.
- 2.- El contenido de antocianinas y taninos es variable en las especies de uvas y es mayor o menor según el grado de madurez y clima de la región.
- 3.- El tiempo de añejamiento y tipo de material de que está hecho el recipiente que contiene al vino durante su almacenamiento influyen también en sus propiedades.
- 4.- Las técnicas de análisis se mejoran cada vez más, haciéndose más eficientes y rápidas las determinaciones de los componentes, mejorándose así la calidad.

8.- BIBLIOGRAFIA

R E F E R E N C I A S .

- 1.- Ribéreau-Gayon, P., "Recherches sur les anthocyanes - des végétaux. Application au genre Vitis ", Libr. Gen. Enseignement, Paris, 1959.
- 2.- Ribéreau-Gayon, P., "Les composés phénoliques du raisin et du vin", Institut national de la Recherche agronomique, Paris (1964).
- 3.- Ribéreau-Gayon, P., "Les composés phénoliques des végétaux, " Dunod, Paris, (1968).
- 4.- Ribéreau-Gayon, P., "Plant Phenolics", Oliver and - Boyd, Edinburgh, 1972.
- 5.- Stonestreet, E., "Contribution à l'étude des tanins - de la matière colorante des vins rouges", Thèse doctoract 3eme cycle, Bordeaux, 1965.
- 6.- Wilhé. J.C., "Recherches technologiques sur les composés phénoliques des vins rouges, "Thèse doctorat, Borodeaux, 1969.

- 7.- Glories, Y., "Essais de détermination de l'état de -
condensation des tanins des vins rouges, "Thèse doc-
torat 3éme cycle, Bordeaux, 1971.
- 8.- Singleton, V.L., Esau, P., "Phenolic Substances in -
Grapes and Wine and their Significance, "Academic, -
New York, 1969.
- 9.- Willster, R., Zollinger, E. H., Ann. Chim. (1915) -
83, 408.
- 10.- Karrer, P., Wildmer, F., Helv. Chim. Acta (1927) 10,-
5.
- 11.- Robinson, G. W., Robinson, R., Blochen. J. (1932) -
26, 1647.
- 12.- Gueffroy, D.E., Kepner, R. E., Webb, A. D., Phyto -
chem. (1971) 10, 813.
- 13.- Anderson, D. W., Gueffroy, D. E., Webb, A. D., Kep -
ner, R. E., Phytochem. (1970) 9, 1579.
- 14.- Ribéreau-Gayon, P., C.R. Acad. Agric. (1957) 43, -
197, 596, 821.

- 15.- Berg, H. W., Ann. Technol. Agric. (1963) 12, n^o hors série, 247.
- 16.- Jurd, L., J. Food Sci. (1964) 29, 16.
17. Ribéreau-Gayon, P., Vitis (1974) in press.
- 18.- Webb, A. D., in "Phenolics in Normal and Diseased Fruits and Vegetables", Plant Phenolic Group of North America, United Fruit Co., Norwood, Mass., 1964.
- 19.- Ingalsbe, D. W., Neubert, A. W., Carter, G. W. J. Agr. Food Chem. (1963) 11, 263.
- 20.- Brown, W.L., J. Amer. Chem. Soc. (1940) 62, 2808.
- 21.- Albach, F., Kepner, R. E., Webb, A. D., Amer. J. Enol. Viticult. (1959) 10, 164.
- 22.- Ribéreau-Gayon, P., Ind. Agr. Aliment. (1963) 80, 1079.
- 23.- Bockian, A. H., Kepner, R. E., Webb, A. D., J. Agr.-Food Chem. (1965) 3, 695.

- 24.- Dourmichidzé, S. V., Noustaoubidzé, N.O., Dokl. - Akad. Nauk SSSR (1958) 46, 1197.
- 25.- Dourmichidzé, S. V., Sopromadzé, A.N., Dokl. Akad. - Nauk SSSR Géorgie (1963) 30, 163.
- 26.- Cappelleri, G., Riv. Viticult. Enol. (1965) 8, 350.
- 27.- Getov, G., Petkov, G., Witt. Rebe Wein (1966) 16, - 207.
- 28.- Swain, T., Bate-Smith, E.C., in "Comparative Biochemistry," Vol. III, A.M., Florkin, H. S. Mason, Eds., Academic, New York, 1962.
- 29.- Jur, L., Amer. J. Enol. (1969) 20, 191.
- 30.- Thompson, R. S., Jacques, D., Haslam, E. Tanner, - R.J.N., J. Chem. Soc., Perkin I (1972) II, 1387.
- 31.- Weinges, K., Wild, R., Kaltenhauser, W., Z. Lebensm. Unters. Forsch. (1969) 140, 129.
- 32.- Bhatia, V. K., Madhav. R., Curr. Sci. (1968) 37, 582.

- 33.- Weinges, K., Gorissen. H., Lontie, R., Ann, Physiol. Veg. (1969) 11, 67.
- 34.- Michaud, J., Masquelier, J. Bull, Soc. Chim.Biol. - (1968) 50, 1346.
- 35.- Hathaway, D.E., Seakins, J.W.T., Biochem. J. (1957)- 67, 239.
- 36.- Boubals, D., Cordonier, R., Pistre, R., C.R. Acad. - Agr. (1962) 48, 201.
- 37.- Dorier, P., Veralle, L.P., Ann. Fals, Expert. Chim.- (1966) 59, 1.
- 38.- Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E., Bull. Soc. Chim. (1965) 9, 2649.
- 39.- Masquelier, J., Vitte, G., Ortéga, M., Bull. Soc. - Pharm. Bordeaux (1959) 98, 145.
- 40.- Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E., Chimie Anal. - (1966) 48, 188.
- 41.- Swain, T., Hillis, W.E., J. Sci. Food Agr. (1959) 1, 63.

- 42.- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., C. R. Acad. Sci. -
(1971) 273 D, 2369.
- 43.- Somers, T. C., Nature (1966) 209, 368.
- 44.- Sudraud, P., "Etude expérimentale de la vinification
en rouge", Doctoral Thesis, University of Bordeaux,-
1963.
- 45.- Sudraud, P., Ann. Technol. Agr. (1958) 7, 203.
- 46.- Ribéreau-Gayon, P., Conn. Vigne Vin (1971) 5, 87.
- 47.- Ibid. (1971) 5, 247.
- 48.- Ribéreau-Gayon, P., Sudraud, P., Vilhé, J. C., Can-
bas, A., Conn. Vigne Vin (1970) 2, 133.
- 49.- Ribéreau-Gayon, P., Sudraud, P., Vilhé, J. C. Conn.-
Vigne Vin (1970) 1, 63.
- 50.- Somers, T. C., Phytochem. (1971) 10, 2175.
- 51.- Timberlake, C. F., Bridle, P., Chem. Ind. (1968) -
1489.

R E F E R E N C I A S (2)

- 1.- Dujardin, J., Dujardin, L., Dujardin, R., "Notice sur les instruments de precision appliques a l'oenologie", Dujardin-Salleron, Paris, 1928.
- 2.- Amerine, M.A., J. Ass. Off. Agr. Chem. (1961) 44,380.
- 3.- "Official Methods of Analysis, 11th ed., Association of Official Agricultural Chemist, Washington, 1970.
- 4.- "Recueil des Methodes Internationales d'Analyse des Vins, "Office International de la Vigne et du Vin, Paris, 1962-1972.
- 5.- Amerine, M. A., Ough, C. S., "Wine and Must Analysis"; Wiley, New York, 1974. (see also Encycl. Ind. Chem. - Anal. 18, in press.)
- 6.- Amerine, M. A., "Laboratory Procedures for Enologists"; Associated Students Book Store, Davis, 1970.
- 7.- Amerine, M. A., Wine Inst. Technol. Advis. Comm., June 14, 1971.
- 8.- Amerine, M.A., Berg, H. W., Cruess, W.V., "The Technology of Wine Making", 3rd ed., Avi, Westport, 1972.

- 9.- Amerine, M.A., Joslyn, M.A., "Table Wines. The Technology of Their Production," University of California, Berkeley, Los Angeles, 1970.
- 10.- Jaulmes, P., Mestres, R., Mendrou, B., Ann. Fals. Ex pert. Chim. (1964) 57, 119.
- 11.- Joslyn, M. A., "Methods in Food Analysis. Physical, Chemical and Instrumental Methods of Analyses", 2nd. ed., Academic, New York, London 1970.
- 12.- "Uniform Methods of Analyses for Wines and Spirits", American Society of Enologists, Davis, 1972.
- 12a.- Joslyn, M.A., Amerine, M.A., "Dessert, Appetizer and Related Flavored Wines. The Technology of Their Production", University of California, Berkeley, 1964.
- 13.- Frank, R., Junge, C., "Weinanalytik. Untersuchung - von Wein und ähnlichen alkoholischen Erzeugnissen so wie von Fruchtsäften", Carl Heymanns Verlag, Köln, - 1970.
- 14.- Henning, K., Jakob, L., "Chemische Untersuchungsme - thoden für Weinbereiter und Sussmosthersteller", - 6th ed., Verlag Ulmer, Stuttgart, 1972.

- 15.- Hess, D., Koppe, F., in "Handbuch der Lebensmittel - Chemie, "vol. VII, "Alkoholische Genussmittel, "Springer-Verlag, Berlin, 1968.
- 16.- Jaulmes, P., "Analyse des Vins", 2nd ed., Librs. Coulet, Dubois et Poulain, Montpellier, 1951.
- 17.- Kourakou-Dragon, S., "Diethneis Methodoi Analyseos - ton Glefkon Ke Oinon, "Ektyposis Institutououtou Georgikis Mechanologias, Athens, 1971.
- 18.- Mori, L., "Methodi Regionali di Analisi nella Moderna Technica Enologica", 2nd ed. Luigi Scialpi Editore, Rome 1967.
- 19.- Nilov, V. I., Skurikhin, I. M., "Khimiya Vinodeliya i Kon'yachnogo Proizvodstva", 2nd ed., Pishchepromizdat, Moscow, 1967.
- 20.- Rankine, B.C., "Principles and Pitfalls of Winery - Analyses", Gawler Adult Education Centre, Oenology - Course for Winemakers, 1961.
- 21.- Rentschler, H., Tanner, H., "Anleitung für die Getränke-Analyse, "6th ed., Eidg. Forschungsanstalt, - Wädenswil, 1971.

- 22.- Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Sudraud P., Ribé -
reau-Gayon, P., "Analyse et Contrôle des Vins, " Du-
nod, Paris, 1972.
- 23.- Vogt, E., Bieber, H., "Weinchemie und Weinalyse", -
3rd ed., Verlag E. Ulmer, Stuttgart, 1970.
- 23a.-Jakob, L., All. Deut. Weinfachztg (1971) 107, 1163.
- 24.- Rebelein, H., Allgem. Deut. Weinfachztg. (1971) 107,
590.
- 25.- Schmitt, A., Allgem. Deut. Weinfachztg. (1971) 107,-
1962.
- 26.- Schmitt, A., Deut. Weinbau. (1972) 27, 57.
- 27.- Sarris, J., Morfaux, J.N., Dupuy, P., Hertzog, D., -
Ind. Aliment. Agr (1969) 86, 1241.
- 28.- Wanger, O., Mitt. Geb. Lebensmunters. Hyg. (1969) 60,
271.
- 29.- Lie, S., Haukeli, A. D., Gether, J., Brugmesteren. -
(1970) 27, 281.

- 30.- Tannor, H., Brunner, E., W., Mitt. Geb. Lebensmitte-
lunters. Hyg. (1964) 55, 480.
- 31.- Dyer, R. H., J. Ass. Off. Anal. Chem. (1972) 55, 564.
- 32.- Martin, G.E., Caggiano, G., Beck, J.E., J. Ass. Off.
Agr. Chem (1963) 46, 297.
- 33.- Piloni, G. J., Rankine, B.C., Hatcher, C.J., Aust. -
J. Wine, Brew. Spirit Rew. (1972) 91, 62.
- 34.- Jakob. L., Rebe Wein. (1971) 25, 44.
- 35.- Postal, W., Drawert, F., Maccagnan, G., Chem., Mikro-
biol., Technol. Lebensm. (1971) 1, 11.
- 36.- Rebelein, H., Steinert, H., Ger. Offen. (1971) 2, -
126.
- 37.- Wucherpfennig, K., Bretthauer, G., Wein-Wiss. (1971)
26, 405.
- 38.- Sarris, J., Morfaux, J.N., Dervin, L., Connais. Vigne
Vin (1970) 4, 431.

- 39.- Wuecherpffenning, K., Jahresber, Hess. Fprachungsanstalt Wein. Obst. Gartenbau. Geisenheim. (1972) 1971, 46.
- 40.- Deibner, L., Bernard, P., Chim. Anal. Paris (1970) - 54, 412.
- 41.- Jakob, L., Weinblatt. (1970) 64, 461.
- 42.- Lay, A., Mitt. Rebe Wein, Obst. Fruchteverwert. - (1970), 20, 85.
- 43.- Rebelein, H., Mitt.- Bl. GDCH-Fachgr. Lebensmittelchem. gerichtl, Chem. (1969) 23, 107.
- 44.- Tanner, H., Sandoz, M., Schweiz. Z. Obst. Weinbau, - (1972) 108, 251.
- 45.- Stanescu, C., Bull. O.I.V. (Off. Intern. Vigne Vin)- 1972) 45, 785.
- 46.- Junge, C., Deut. Lebensm. Rundsch. (1970) 66, 421.
- 47.- Lotti, G., Baldacci, P.V. Riv. Viticolt. Enol. (1970) 23, 262.

- 48.- Rebelein, H., Bull. (Off. Int. Vigne Vin) (1968)-
41, 344.
- 49.- Rebelein, H., Deut. Lebensm. Rundsch. (1967) 63, -
233.
- 50.- Warck, D., Berg, H., Deut. Lebensm. Rundsch. (1972)
68, 262.
- 51.- Varjú, M., Z. Lebensm. Unters. (1972) 48, 268.
- 52.- Brunn, S., Bonnemaire, J.P., Rev. Franc. Ocnol. -
(1971) 43 (3), 12.
- 53.- Polo, M.C., Garrido, M.D., Llaguno, C., Garrido, -
J. Rev. Agroquim. Technol. Aliment. (1969) 9, 600.
- 54.- Raik, S. Ya., Kryzhamovskaya, E. Kh., Sadovod. Vi-
nograd, Vinodel. Mold. (1970) 25 (3), 36.
- 55.- Barros, M.H.B., v. de, Estud, Notas Relatorios. -
Porto (1971) 7, 59.
- 56.- Hadorn, H., Zücher, K., Ragnerson, V., Mitt. Geb.
Lebensmittelunters. Hyg. (1967) 58, 1.
- 57.- Hrazdina, G., J. Arg. Food Chem (1970) 18, 243.

- 58.- Schmidt-Hebbel, H., Michelson, W., Masson, L., Stal-
tzer, H., Z. Lebensm. Unters. Forsch. (1968) 137, -
169.
- 59.- Drawert, F., Kupfer, G., Fresenius Z. anal. Chem. -
(1966) 211, 89.
- 60.- Ribéreau-Gayon, P., Bertrand, A., Vitis. (1972) 10,
318.
- 61.- Ough, C.S., Cooke, G.M., Wines Vines. (1966) 27 (8),
27.
- 62.- Parenthoen, A., Ann. Fals. Expert. Chim. (1972) 65,
279.
- 63.- Schopfer, J. F., Regamey, R., Rev. Suisse Viticult.
(1971) 3, 107.
- 64.- Rotolo, A., Riv. Viticult. Enol. (1972) 25, 301..
- 65.- Woidlich, H., Gnauer, H., Tunka, J., Z. Lebensm. -
Unters, Forsch. (1971) 147, 284.

- 66.- Matthey, E., Rentschler, H., Schopfer, J. F., -
Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. (1971) 62, 101.
- 67.- Lemperle, E., Kerner, E., Fresenius Z. anal. Chem.
(chem. (1969) 249, 49.
- 68.- Vitali, G., Ind. Aliment. Pinerolo, Italy (1970) -
9, 71.
- 69.- Bandion, F., Mitt. Rebe Wein, Obstbau Frachtwert -
wert. Klosterneuburg (1969) 19, 37.
- 70.- Hara, S., Murakami, H., Marukawa, K., Omata, Y., Sa-
kakura, I., J. Ferment. Technol. (1970) 48, 616.
- 71.- Wunderlich, H., J. Ass. Off. Anal. Chem. (1972) 55,
557.
- 72.- Hoppe, H., Romminger, K., Nahrung (1969) 13, 227.
- 73.- Bates, B. L., J. Ass. Off. Anal. Chem (1970) 53, -
775.
- 74.- English, E., Analyst (1959) 84, 465.
- 75.- Haller, H. E., Junge, J., Deut. Lebensm. Rundsch.-
(1971) 67, 231.

- 76.- Gymon, J. F., Ough, C. S., Amer. J. Enol. Viticult.
(1962) 13, 40.
- 77.- Wong, G., Caputi, Jr., A., Amer. J. Enol. Viticult.
(1966) 17, 174.
- 78.- Owades, J. L., Dono, J.M., J. Ass. Off. Anal. Chem.
(1968) 51, 148.
- 79.- Pato, M. A. da S., Pato, M. II. M. L. da S., De V
inea et Vino Port. Doc. (1972) 6 (3), 1.
- 80.- Kunkee, R. E., Wines Vines (1968) 49 (3), 23.
- 81.- Mayer, K., Busch, I., Mitt. Geb. Lebensmittelunters.
Hug. (1963) 54, 60.
- 82.- Poux, G., Ann. Technol. Agr. (1969) 18, 359.
- 83.- Peynaud, E., Lafon-Lafourcade, S., Ann. Technol. -
Agr. (1965) 14, 49.
- 84.- Tarantola, C., Castino, M., Ann. Fac. Sci. Agr. -
Univ. Torino. (1962) 1, 137.
- 85.- Martiniere, P., Sudraud, P., Connais. Vigne Vin. -
(1968) 2, 41.

- 86.- Hill, G., Caputi, Jr., A., Amer. J. Enol. Viticult.
(1970) 21, 153.
- 87.- Rebelein, H., Mitt.-Bl. GDCh-Fachgr. Lebensmittel-
chem. gerichtl. Chem (1970) 24, 14.
- 88.- Tanner, II., Sandoz, M., Schweiz, Z. Obst. Weinbau.
(1972) 108, 251.
- 89.- Fal'kovich, Y. E., Gun'ko, G. P., Avenes'yants, →
R.V., Vinodal. Vinograd. SSSR (1972) 32 (4), 38.
- 90.- Pilone, G. J., Kunkee, R. E., Amer. J. Enol. Viti-
cult. (1970) 21, 12.
- 91.- Mayer, K., Pause, G., Mitt. Geb. Lebensmittelunters.
Hyg. (1965) 56, 454.
- 92.- Mayer, K., Pause, G., Lebensm.- Wiss. Technol. -
(1969) 2, 143.
- 93.- Addeo, F., Sci. Technol. Aliment. (1972) 2, 87.
- 94.- Rebelein, H., Deut. Lebensm. Rundsch. (1967) 63, -
- 95.- Martin, G. E., Sullo, J. G., Schoeneman, R. L., J.
Agr. Food Chem. (1971) 19, 995.

- 96.- Guymon, J. F., Wright, D. L., J. Ass. Off. Anal -
Chem. (1967) 50, 305.
- 97.- Jaulmes, P., Espezel, P., Ann. Fals. Fraudes. -
(1935) 28, 325.
- 98.- Jaulmes, P., Hamelle, G., Ann. Fals. Expert. Chim.
(1961) 54, 338.
- 99.- Burroughs, L. F., Sparks, A. H., Analyst (London)
(1961) 86, 381.
- 100.- Heintze, K., Braun, F., Z. Lebensm. Unters. Forsch
(1970) 142, 40.
- 101.- Rebelein, H., Deut. Lebensm. Rundsch. (1970) 66,6.
- 102.- Then, R., Radler, F., Z. Lebensm. Unters. Forsch.
(1968) 138, 163.
- 103.- Andre, L., Ann. Technol. Agr (1966) 15, 159.
- 104.- Morrison, R. L., Amer. J. Enol. Viticult. (1962)-
13, 159.
- 105.- Ough, C. S., Fong, D., Amerine, M. A., Amer. J. -
Enol. Viticult. (1972) 23, 1.

- 106.- Mayer, K., Busch, I., Mitt. Geb. Lebensmittelun-
ters. Hyg. (1963) 54, 297.
- 107.- Captuti, Jr., A., Ueda, M., Amer. J. Enol. Viti-
cult. (1967) 18, 66.
- 108.- Cameron, A. G., Hackett, D. R., J. Sci. Food Agr.
(1970) 21, 535.
- 109.- Strunk, D. H., Andreasen, A. A., J. Ass. Off. -
Anal. Chem. (1967) 50, 334, 338.
- 110.- Barldi, D., Nikolai, K. Stehlik, G., Altmann, H.,
Keindl, K., Inst. Biol. Agr. Seibersdorf Reactor
Centre (1968) Spr. No. 17.
- 111.- Meredith, W. K., Baldwin, S., Anreassen, A. A., J.
Ass. Off. Anal. Chem. (1970) 53, 12.
- 112.- Bergner, K. G., Lang, B., Deut. Lebensm. Rundsch.
(1971) 67, 121.
- 113.- Bloudin, J., Llorca, L., Leon, P., Connais. Vigne_
Vin. (1971) 5, 99.
- 114.- Weger, B., Riv. Viticult. Enol (1968) 21, 441.

- 115.- Seider, A. I., Datunashvili, E.N., Vinodel. Vinograd. SSSR (1972) 32 (6), 31.
- 116.- Singleton, V.L., Rossi, Jr. J. A., Amer. J. Enol. Viticult. (1965) 16, 144.
- 117.- Singleton, V. L., Esau, P., "Phenolic Substances in Grapes and Wines, and Their Significance, "Academic, New York, London, 1968.
- 118.- Ribéreau-Gayon, P., Rev. Franc. Ocnol. (1971) 11, 25.
- 119.- Ribéreau-Gayon, P., Chim. Anal (1970) 52, 627.
- 120.- Plumas, B., Sautier, C., Ann. Fals. Expert. Chim. 66, 332.
- 121.- Ough, C. S., Berg, H.W., Chichester, C.O., Amer.- J. Enol. Viticult. (1962) 13, 32.
- 122.- Berg, H.W., Ough, C. S., Chichester, C.O., J. Food Sci. (1964) 29, 661.
- 123.- Koch, J., Hess, D., Gruss, R., Z. Lebensm. Unters. Fosch. (1971) 147, 207.

- 124.- Kahn, J. H., Conner, H. A., J. Ass. Off. Anal. -
Chem. (1972) 55, 1155.
- 125.- Postal, W., Drawert, F., Adam, L., Chem., Mikro -
biol., Technol. Lebensm. (1972) 1, 169.
- 126.- Niketié-Aleksisé, G. K., Hrazdina, G., Lebensm. -
Wissen. Technol. (1972) 5, 163.
- 127.- Spanyol, P., Kavel, E., Blazovich, M., Fr. Viticol
o (Nontpellier) (1972) 4, 131.
- 128.- Litchev, V., Gorenov, N., Albert, H., Yanakiev, M.
Bull. O.I.V. (Off. Intern. Vigne Vin) (1972) 45,-
1059.
- 129.- Tsyboul'kova, L.P., Balanoutse, A.P. Khranov, -
A.V., Niloy, B.I., Datounaschvili, E. N., Vinodel.
Vinograd. SSSR (1972) 32 (4), 30.
- 130.- Charalambous, G., Bruckner, K.J., Hardwick, A., -
Linnebach, A., Master Brew. Ass. Amer. Tech. -
Quart. (1973) 10, 74.
- 131.- Izard-Verchere, C., Viel, C., Bull. Soc. Chim. Fr.
(1972) 5, 2089.