



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA  
DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CUANTITATIVOS  
DE LA CALIDAD DE VINOS TINTOS VARIEDAD  
CABERNET SAUVIGNON**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO**

**PRESENTA:**

**EDUARDO MADRIGAL LAGUNAS**



**Ciudad Universitaria, CDMX, 2022**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** DR. Eugenio Octavio Reyes Salas  
**VOCAL:** M. EN C. Francisco Rojo Callejas  
**SECRETARIO:** Q.F.B. Gloria García Ramírez  
**1er. SUPLENTE:** DR. Evangelina Camacho Frías  
**2° SUPLENTE:** M. EN B. Juan Rolando Vázquez Miranda

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LABORATORIO 114, SÓTANO DEL EDIFICIO B  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, DEPG  
FACULTAD DE QUÍMICA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**ASESOR DEL TEMA:**

\_\_\_\_\_  
DR. EUGENIO OCTAVIO REYES SALAS

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

\_\_\_\_\_  
M. EN C. EDGAR ISLAS ORTIZ

**SUSTENTANTE:**

\_\_\_\_\_  
EDUARDO MADRIGAL LAGUNAS

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por brindarme una formación académica integral, pero también una formación personal llena de valores e ideales a través de todos los profesores, compañeros y personal que me topé en el camino durante mi estancia en esta casa de estudios.

A los miembros del jurado por todos sus comentarios y sugerencias aportados a este trabajo para corregirlo, complementarlo y enriquecerlo.

Al Dr. Octavio Reyes Salas por abrirme las puertas de su laboratorio para trabajar con él, por guiarme académica y personalmente y enseñarme que el pensamiento crítico siempre debe imperar en nuestras acciones tanto dentro y fuera del laboratorio, pero sobre todo por tenerme la paciencia y dejarme madurar académicamente a mi tiempo con este proyecto.

Al M. en C. Edgar Islas Ortiz por todas las enseñanzas y vivencias que hemos pasado juntos desde que llegué al laboratorio 114; por sus comentarios y observaciones a este escrito; por todas esas veces que me sacó de mis apuros técnicos; por la paciencia y sobre todo por el apoyo cuando se me dificultaban los experimentos.

A todos los que compartieron el laboratorio durante la realización de mi tesis; Gerardo, Ángel, Leo, Pachas, Cruzito, Sara, John, Alex, Erik y Luis Eduardo. Hicieron que el ambiente de trabajo fuera muy ameno.

Al Colegio de Profesores de la Facultad de Química y la sección 024 de AAPAUNAM por el apoyo otorgado en la cátedra “Enrique García Galeano”.

# CONTENIDO

<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
<b>2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>8</b>
2.1 Justificación .....	8
2.2 Objetivo general .....	9
2.3 Objetivos particulares .....	9
<b>3 ANTECEDENTES.....</b>	<b>11</b>
3.1 El vino.....	11
3.1.1 <i>Historia del vino.....</i>	<i>11</i>
3.1.2 <i>Consumo y aspectos relacionados a la salud .....</i>	<i>15</i>
3.1.3 <i>La vid .....</i>	<i>16</i>
3.1.4 <i>Tipos de vino.....</i>	<i>17</i>
3.1.5 <i>Vinos tintos variedad Cabernet Sauvignon .....</i>	<i>19</i>
3.2 Composición química del vino .....	20
3.2.1 <i>Azúcares .....</i>	<i>21</i>
3.2.2 <i>Ácidos orgánicos.....</i>	<i>23</i>
3.2.3 <i>Alcoholes .....</i>	<i>25</i>
3.2.4 <i>Compuestos fenólicos.....</i>	<i>26</i>
3.3 Clasificación del vino .....	28

3.3.1 De acuerdo al contenido de azúcares.....	29
<b>4 PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>30</b>
4.1 Generalidades .....	30
4.2 Reactivos.....	31
4.3 Equipos y material .....	31
4.4 Muestras.....	32
<b>5 MÉTODOS DE ANÁLISIS .....</b>	<b>34</b>
5.1 Pruebas a realizar .....	34
5.2 Determinación de azúcares reductores residuales.....	34
5.3 Determinación de sacarosa.....	36
5.4 Estudio del efecto de la clarificación con carbón activado.....	37
5.5 Determinación de pH y acidez.....	38
5.6 Determinación de polifenoles totales por espectrofotometría .....	39
5.7 Determinación de polifenoles totales por potenciometría .....	41
<b>6 RESULTADOS Y ANÁLISIS .....</b>	<b>43</b>
6.1 Azúcares reductores residuales .....	43
6.2 Sacarosa invertida.....	48
6.3 Efecto de la clarificación con carbón activado .....	50
6.4 Acidez y pH .....	52
6.5 Polifenoles totales por espectrofotometría .....	57
6.6 Polifenoles totales por potenciometría.....	65

*6.6.1 Estudio electroquímico de la reducción del yodato con ácido gálico 65*

*6.6.2 Determinación de antioxidantes totales en muestras por potenciometría ..... 68*

**7 CONCLUSIONES ..... 73**

**8 BIBLIOGRAFÍA ..... 75**

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Representación de la pisada y vendimia de la uva en Tebas, Egipto. Pintura de una de las paredes de la tumba del escriba Najt, alrededor de 1410-1370 a. C.	12
<b>Figura 2.-</b> La Bacanal de los Andrios de Tiziano (1523 – 1526) es una de las pinturas renacentistas más importantes. Esta pintura se encuentra en el Museo del Prado, España.	13
<b>Figura 3.-</b> Insecto de la Filoxera ( <i>Daktulosphaira vitifoliae</i> ) en sus distintas formas y cómo se ve una hoja de la vid infectada.	14
<b>Figura 4.-</b> Morfología general de <i>Vitis vinífera</i> .	17
<b>Figura 5.-</b> Racimos de uva variedad Cabernet Sauvignon.	20
<b>Figura 6.-</b> Composición promedio para un vino tinto (Compound Interest, 2014).	21
<b>Figura 7.-</b> Estructura básica de los compuestos flavonoides (Jackson, 2008).	27
<b>Figura 8.-</b> Estructuras base de los ácidos benzoicos (A), ácidos cinámicos (B) y uno de los estilbenos más importantes, el <i>trans</i> -resveratrol (C). (Cervantes Díaz, 2013)	28
<b>Figura 9.-</b> Esquema del montaje de material y equipo utilizado para la determinación de azúcares reductores.	35
<b>Figura 10.-</b> Esquema del montaje de equipo y material para la determinación de pH y acidez.	39
<b>Figura 11.-</b> Esquema de trabajo para la determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.	41
<b>Figura 12.-</b> Montaje de equipo y material para la determinación de compuestos fenólicos totales por vía potenciométrica.	42
<b>Figura 13.-</b> Curva de la valoración potenciométrica de la muestra “Aromo Reservado” diluida 1:2 con el licor de Fehling (3.0 mL de la disolución A + 3.0 mL de la disolución B).	45
<b>Figura 14.-</b> Determinación de la acidez titulable en una alícuota de 5.0 mL de vino “Aromo” con una disolución patrón de NaOH 0.0527 mol L <sup>-1</sup> .	53
<b>Figura 15.-</b> Disoluciones de los estándares de ácido gálico y las muestras preparadas con el reactivo de Folin-Ciocalteu antes y después de las 2 horas de reposo.	59
<b>Figura 16.-</b> Espectros de absorción de los estándares de ácido gálico y de las muestras diluidas 1:10 preparados con el reactivo de Folin-Ciocalteu.	60
<b>Figura 17.-</b> Curva de calibración de los estándares de ácido gálico midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 745 nm.	61
<b>Figura 18.-</b> Curva experimental obtenida de la titulación potenciométrica de ácido gálico 0.02 mol L <sup>-1</sup> con 5.0 mL de yodato 0.10001 mol L <sup>-1</sup> en medio ácido.	66
<b>Figura 19.-</b> Titulación potenciométrica de la muestra Emiliana sin diluir con 5.0 mL de KIO <sub>3</sub> 0.10001 mol L <sup>-1</sup> en medio ácido.	68

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Reactivos utilizados.	31
<b>Tabla 2.-</b> Información de las muestras de vino.	33
<b>Tabla 3.-</b> Contenido de azúcares reductores en las muestras determinados por la reacción de Fehling y su clasificación de acuerdo con la OIV.	47
<b>Tabla 4.-</b> Contenido de sacarosa invertida en las muestras determinada por la reacción de Fehling con previa hidrólisis ácida.	49
<b>Tabla 5.-</b> Determinación de azúcares reductores en muestras sin clarificar y clarificadas con carbón activado por medio de la reacción de Fehling.	51
<b>Tabla 6.-</b> Resultados de la medición del pH en las muestras.	52
<b>Tabla 7.-</b> Resultados de acidez titulable expresada como miliequivalentes determinados por el método de la 1ra derivada y a distintos valores de pH.	55
<b>Tabla 8.-</b> Resultados de acidez titulable expresada como gramos de ácido tartárico determinados por el método de la 1ra derivada y a distintos valores de pH.	56
<b>Tabla 9.-</b> Composición y concentración de los estándares de ácido gálico.	58
<b>Tabla 10.-</b> Concentraciones finales de ácido gálico y algunas muestras con sus respectivas absorbancias medidas a 745 nm.	62
<b>Tabla 11.-</b> Contenido de polifenoles totales expresados como equivalentes de ácido gálico para las muestras obtenido por el método de Folin-Ciocalteu.	64
<b>Tabla 12.-</b> Contenido de polifenoles totales, expresado como equivalentes de ácido gálico, obtenido por potenciometría.	71
<b>Tabla 13.-</b> Resultados del contenido de polifenoles totales en las muestras y expresado como equivalentes de ácido gálico obtenido por espectrofotometría y por potenciometría.	71

# 1 INTRODUCCIÓN

El vino es una de las bebidas fermentadas más antiguas que ha producido el hombre a lo largo de su historia, por lo que su producción y consumo han sido de gran importancia en diferentes contextos tanto sociopolíticos como religiosos.

Así pues, la industria vinícola ha ido evolucionando la forma en la que se llevan a cabo los distintos procesos de cultivo, cosecha, maceración, fermentación, añejamiento, etc., para producir cada vez vinos de mejor calidad. Es por ello que, dentro del proceso de producción del vino, se utilizan distintos análisis en cada etapa; uno de ellos es el análisis químico, el cual funge como base indicadora para el inicio y termino de cada etapa; esto se logra monitoreando los niveles de los distintos compuestos presentes en la uva y el mosto, así como también en el vino una vez que está en barrica o botella para su añejamiento. Gracias a este tipo de análisis se sabe que los vinos pueden llegar a tener hasta más de 1000 compuestos diferentes (Compound Interest, 2014).

A pesar de ser una matriz tan compleja, a lo largo del tiempo los vinicultores han aprendido que principalmente son cuatro los factores que se deben combinar para dar balance al producto final; el contenido de azúcares, el grado alcohólico, la acidez y los compuestos polifenólicos (Garritz , 2011). Además, una buena combinación de estos factores va de la mano con las características organolépticas que busca cada vinicultor en su vino. Así pues, el proceso de producción vinícola no sólo se basa en un tipo de análisis, sino que intervienen también el análisis sensorial y la experiencia del fabricante además del análisis químico, todo esto en conjunto es lo que asegurará conseguir un vino único y de calidad.

## 2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

### 2.1 Justificación

El presente proyecto está dirigido principalmente al análisis químico de dos de los parámetros que determinan la calidad en el vino; los azúcares reductores y los compuestos polifenólicos. Además, se estudió y determinó la acidez titulable, conformada por ácidos orgánicos que, aunque se encuentran en baja concentración, también intervienen de manera importante en características como el aroma, el sabor, el color y la conservación del vino con el fin de complementar la caracterización de las muestras.

Actualmente se usan distintas técnicas para la determinación de la concentración de estos compuestos; la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) establece dentro de sus métodos analíticos, análisis para medir la concentración de azúcares, alcoholes, ácidos, compuestos metálicos, compuestos nitrogenados, taninos, etc. Sin embargo, la mayoría de dichos análisis se basan en técnicas fisicoquímicas y análisis biológicos que generalmente requieren de un pretratamiento de la muestra, son tardados y de altos costos; esto representa un problema para los vinicultores ya que requieren que el análisis químico sea rápido, eficaz y que aporte información que pueda ayudar al vinicultor a determinar el inicio y fin de las diferentes etapas del proceso de producción, como por ejemplo: el grado de maduración de la uva para la vendimia, los niveles de azúcares en la etapa de fermentación y la cantidad de taninos en el añejamiento, entre otros.

Algunas de las técnicas más utilizadas actualmente para los métodos de análisis en la industria vinícola son:

- Cromatografía de gases y HPLC.
- Espectrofotometría de absorción atómica y de emisión de llama.
- Espectroscopía IR y espectrometría de masas.
- Resonancia magnética nuclear.
- Métodos enzimáticos (kits enzimáticos).

Por lo tanto, nace la necesidad de desarrollar nuevos métodos de análisis basados en otras técnicas para la cuantificación de los principales compuestos de interés para los vinicultores que sean más rápidos, sencillos y de menor costo en comparación con los que existen actualmente; esto con el fin de complementar la parte del análisis sensorial, que se realiza a la par, y tener un fundamento cuantitativo que respalde lo cualitativo.

Los analitos mencionados como objeto de estudio de este proyecto son compuestos que presentan propiedades oxidorreductoras, por lo que se podrían analizar electroquímicamente. Así, la química analítica y sus técnicas como la potenciometría, representan una gran herramienta potencial para la industria vinícola, ya que sus métodos utilizan cantidades de muestra pequeñas que generalmente no requieren pretratamientos complicados y son mucho más rápidos comparados con los métodos fisicoquímicos usados actualmente.

## **2.2 Objetivo general**

Desarrollar y aplicar nuevos métodos de análisis, basados en la potenciometría, que sean más rápidos, sencillos y costeables para la determinación cuantitativa de compuestos polifenólicos totales y de azúcares reductores (glucosa más fructosa) presentes en muestras de vino tinto variedad Cabernet Sauvignon como alternativa y complemento a los métodos que se utilizan actualmente.

## **2.3 Objetivos particulares**

- Determinar la concentración de azúcares reductores residuales (glucosa y fructosa, principalmente), por medio de la reacción de Fehling.
- Determinar la concentración de sacarosa invertida, por medio de la reacción de Fehling.
- Determinar la acidez titulable.

- Determinar la concentración de polifenoles totales, por el método de Folin-Ciocalteu.
- Determinar la concentración de polifenoles totales, por valoraciones potenciométricas con yodato ( $\text{IO}_3^-$ ) como oxidante.

## 3 ANTECEDENTES

### 3.1 El vino

En general, se define al vino como la bebida alcohólica obtenida exclusivamente por la fermentación completa o parcial del mosto de uvas frescas y maduras o del mosto de la uva. Su graduación alcohólica puede variar entre el 8% y 16% Alc. Vol., dependiendo de diversos factores como el tipo de uvas utilizadas, el clima, las características del suelo, el momento de la vendimia, los distintos procesos durante la vinificación, etcétera (OIV, 2018).

Esta bebida ha sido de gran importancia junto con la cerveza ya que son de las bebidas alcohólicas más antiguas en la historia de la humanidad. Actualmente, la uva es la fruta más cultivada a nivel mundial y además, el 90% de su producción es destinada a la elaboración de vino (Gillespie, s.f.).

#### 3.1.1 *Historia del vino*

El vino es una bebida envuelta por una gran historia y tradición, ya que ha acompañado al hombre a lo largo de mucho tiempo, incluso se piensa que su consumo comenzó antes del florecimiento de las grandes civilizaciones. Debido a lo anterior, esta bebida ha evolucionado junto con el hombre y aunque no se sabe realmente si fue una invención o un descubrimiento es indiscutible su gran importancia (Noriega Rendón, 2016).

Se han encontrado evidencias de fósiles de hojas y semillas, que pertenecieron a vides silvestres, en cavernas en distintas zonas del planeta, por lo que se puede inferir que este fruto ya formaba parte de la dieta del hombre primitivo. Sin embargo, los orígenes del vino, como bebida fermentada, no son claros; se tienen vestigios de utensilios como vasijas al igual que pinturas mostrando a la vid, el proceso de vinificación y consumo de vino que datan de muchos años antes de Cristo, alrededor de 7000 a 3500 a. C. (Durand Guevara, 1993; Noriega Rendon, 2016). Se cree que su origen pudo haber tenido lugar con los egipcios, los sumerios y los persas, debido

a la evidencia encontrada en distintas zonas arqueológicas ocupadas por estas civilizaciones (Garritz , 2011). Su origen es difuso, pero no por haber poca evidencia, sino todo lo contrario, existe una gran cantidad de vestigios encontrados, por lo que es difícil determinar si la elaboración del vino se difundió de un solo punto, o si tuvo un origen simultáneo en distintas ubicaciones.



**Figura 1.-** Representación de la pisada y vendimia de la uva en Tebas, Egipto. Pintura de una de las paredes de la tumba del escriba Najt, alrededor de 1410-1370 a. C.

Lo que sí es claro es que esta bebida ha sido de gran importancia a lo largo del tiempo, lo cual es evidente debido a las distintas formas en las que el hombre ha buscado preservar el arte de la elaboración de este elixir, así como expresar su gran devoción hacia él; desde pinturas, esculturas y escritos que hacen referencia a la vid y el consumo del vino. Así pues, es bien sabido que culturas como la griega, egipcia y romana tuvieron deidades a las que les adjudicaban el haber traído la vid y, en consecuencia, el vino a sus vidas.

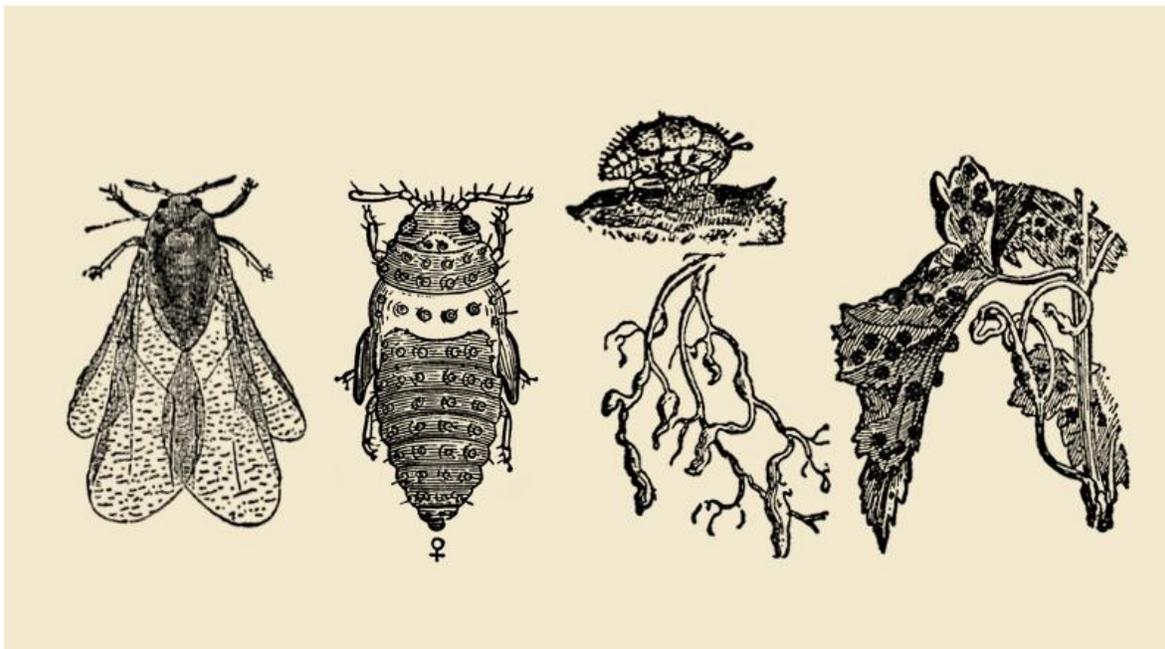
Uno de los libros más famosos, y a la vez más antiguos, es la Biblia, en la cual podemos encontrar varios pasajes donde se menciona a esta bebida. Por ejemplo,

en el antiguo testamento, en el Génesis, se menciona que una vez concluido el diluvio y que Noé pudo pisar la tierra, este comenzó a labrarla y plantó una viña; bebió del vino y se embriagó. Otro famoso pasaje es el primer milagro de Jesús cuando convirtió el agua en vino en las bodas de Caná; también en la Última Cena Jesús usa el vino como símbolo de su sangre (Durand Guevara, 1993).



**Figura 2.-** La Bacanal de los Andrios de Tiziano (1523 – 1526) es una de las pinturas renacentistas más importantes. En ella se representa una fiesta (bacanal) del Dios del vino, Baco, que tiene lugar en la isla de Andros tan favorecida por este Dios que el vino emanaba de un río. Esta pintura se encuentra en el Museo del Prado, España.

El vino tuvo una gran expansión por Europa, Asia, África y América, llegando a este último continente por primera vez con los conquistadores españoles a México (Nieto Godínez, 2010). En América se fueron encontrando regiones propicias para el cultivo de la vid, por ejemplo; el Valle de Guadalupe en México, Nappa Valley en Estados Unidos, el Valle del Maipo en Chile, entre otros. Las vides americanas fueron de gran importancia a finales del siglo XIX cuando tuvo lugar la plaga de la Filoxera, insecto que por poco extermina los viñedos europeos. Irónicamente, la Filoxera llegó a Europa desde América y fue gracias a las especies americanas que se pudo controlar la plaga ya que algunas de ellas son resistentes a dicho insecto. Fue así como se hizo uso de dichas vides como porta injertos para las vides europeas, con lo cual se rescataron muchas de las variedades que hoy conocemos (Durand Guevara, 1993).



**Figura 3.-** Insecto de la Filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) en sus distintas formas y cómo se ve una hoja de la vid infectada.

Actualmente, el consumo y producción de vino se ha globalizado de tal forma que podemos encontrar infinidad de productos en el mercado, los cuales se pueden dividir en dos grandes bloques; los vinos provenientes del Viejo Mundo y los del Nuevo Mundo. Los primeros son, básicamente, vinos producidos en Europa en regiones donde la cultura y tradición del vino son antañas; Italia, España, Grecia, Francia y Alemania son algunos de los países que conforman este grupo. Las técnicas del Viejo Mundo dependen profundamente de la tradición por lo que en estas regiones la normatividad es sumamente estricta. Por otro lado, los vinos del Nuevo Mundo provienen de regiones donde la elaboración del vino es relativamente nueva, como México, Estados Unidos, Chile, Nueva Zelanda, Sudáfrica, entre otros. Los productores de estos países se enfocan más en la experimentación y aplicación de tecnologías modernas para resaltar características específicas y, por ende, en comparación con el Viejo Mundo, la normatividad es mucho menos estricta y, en algunas ocasiones, poco considerada (Wesson, 2008).

La gran expansión del vino se ha alcanzado, por un lado, debido al deseo de los vinicultores de experimentar nuevos procesos, en nuevas regiones, con nuevas condiciones, etc. Y, por otro lado, el del consumidor, debido a la popularidad del maridaje y las características benéficas a la salud que se le atribuyen al consumo moderado de esta bebida.

### ***3.1.2 Consumo y aspectos relacionados a la salud***

El vino se relacionó con aspectos benéficos para la salud prácticamente desde sus inicios hasta el siglo XX; las antiguas civilizaciones lo usaron (como en general, a todas las bebidas alcohólicas) para prevenir y curar enfermedades, como anestésico, vasodilatador, desinfectante, estimulador del apetito y hasta como inductor del sueño (Muñoz Ramos & Ávila Granados, 2001). Fue en el siglo XX cuando se desató una guerra contra las bebidas alcohólicas y los prohibicionistas persuadieron a la sociedad de que este tipo de bebidas eran indeseables para el consumo humano. Sin embargo, a partir de la década de 1990 comienza a resurgir el interés por parte de la comunidad médica sobre los beneficios del consumo moderado del vino (Jackson, 2008).

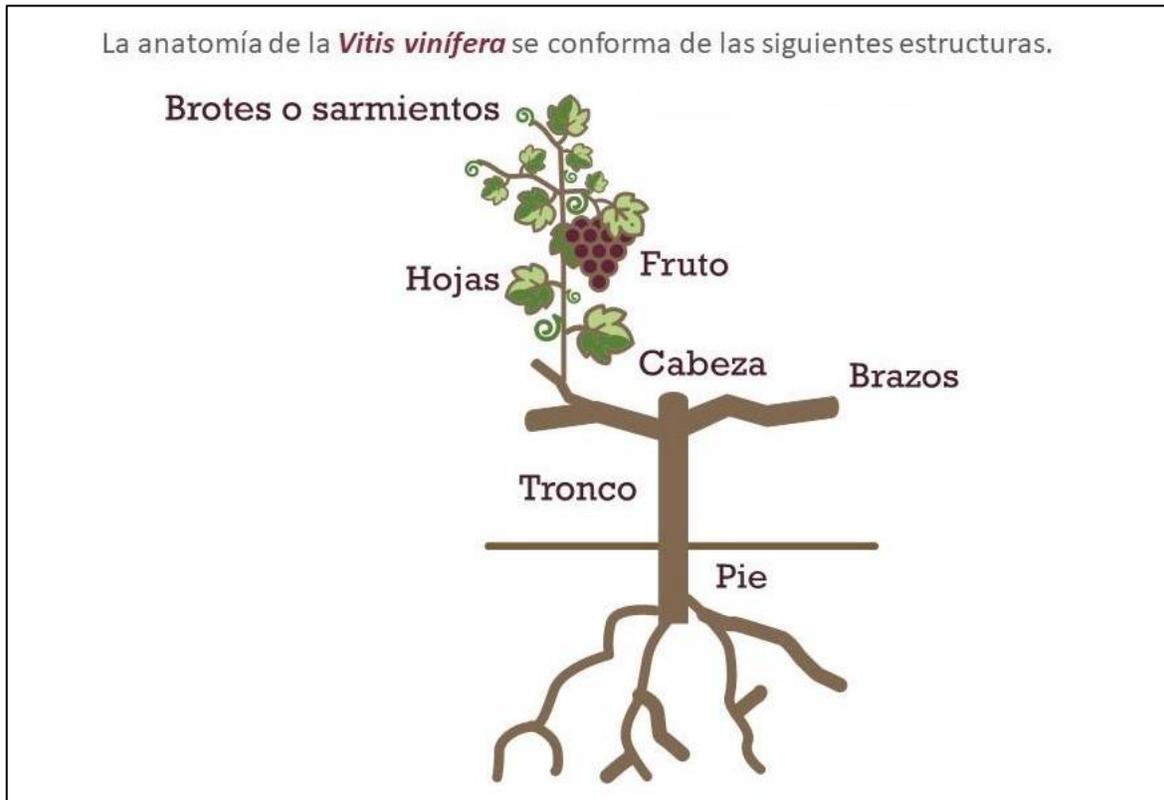
### 3.1.3 La vid

La planta de la vid, parra o viña es un arbusto sarmentoso y trepador que puede llegar a medir hasta más de 30 metros en su vida silvestre pero cuando es tratada por el hombre se poda anualmente quedando reducida a un pequeño arbusto de 1 metro aproximadamente. Su fruto, la uva, es comestible y es la materia prima para la elaboración de vino principalmente, aunque se pueden obtener otras bebidas alcohólicas (Nieto Godínez, 2010). Se puede reproducir por medio de las semillas de la uva, aunque normalmente suelen usarse sarmientos de viejas vides que se plantan sobre la tierra o sobre portainjertos de variedades seleccionadas (Noriega Rendón, 2016).

La vid pertenece a la familia *Vitaceae* la cual se conforma por 12 géneros, aunque hay quien dice que esta familia puede incluir hasta 19. Dentro de estos géneros se encuentran *Ampelopsis* y *Parthenocissus* los cuales incluyen viñas silvestres, y *Vitis* el cual es originario de las zonas templadas o cálidas del hemisferio norte (América, Asia y Europa) y es el responsable de las variedades cultivadas para todas las uvas de mesa, pasas y elaboración de vino alrededor del mundo (Moreno & Peinado, 2012; Nieto Godínez, 2010). El género *Vitis* se divide en dos subgéneros: *Euvitis* y *Muscadinea*. Este género contiene alrededor de 60 especies (Noriega Rendón, 2016) siendo la más importante la *Vitis vinífera* o las especies europeas ya que son las utilizadas para la elaboración de vinos de gran calidad. Por otro lado, se encuentran también las especies americanas *Vitis rupestris*, *riparia*, *berlandieri*, *labrusca*, entre otras que son también de gran importancia porque han sido utilizadas como porta-injertos (Moreno & Peinado, 2012) para producir híbridos resistentes a plagas como la Filoxera ya mencionada, así como para obtener vides con características específicas.

La *Vitis Vinífera* que como ya se dijo, es la especie más utilizada para la elaboración de vino, produce frutos redondos, ovalados o alargados los cuales se aglomeran en un racimo. Dentro de esta especie hay alrededor de 6800 variedades conocidas,

todas ellas son distintas debido a su ubicación geográfica, condiciones climáticas, así como la composición del suelo entre muchos otros factores (Durand Guevara, 1993; Moreno & Peinado, 2012; Nieto Godínez, 2010; Noriega Rendon, 2016).



**Figura 4.-** Morfología general de *Vitis vinífera*.

### **3.1.4 Tipos de vino**

Haciendo hincapié en que se considera vino a la bebida proveniente, estrictamente, de la fermentación alcohólica de la uva y el mosto (jugo de la uva sin fermentar); en el mercado se pueden encontrar productos como los mal llamados vino de manzana, de pera y otros tipos de fruta que sólo confunden al consumidor. A pesar de que dicha definición sea muy puntual y estricta, hay una gran variedad de vinos que se diferencian entre sí por la complejidad misma del vino, pero también por los procesos de elaboración y condiciones en las que se llevan a cabo. En seguida se

muestran algunos de los grupos más importantes con sus principales características:

- *Vino de mesa.* A este grupo pertenecen todos los vinos aptos para el consumo que proceden de variedades de uva autorizadas y cuyo proceso de elaboración está debidamente regulado.
- *Vino blanco.* En el proceso de elaboración de este tipo de vinos no se incluye el proceso de contacto del mosto con los hollejos y semillas. Puede obtenerse tanto de uvas tintas como de blancas.
- *Vino tinto.* Se produce a partir de uvas tintas cuyo color, contenido en los hollejos, es extraído a través de un determinado proceso en la elaboración, la maceración.
- *Vino rosado.* Estos vinos pueden obtenerse de variedades de uva tintas o mezclas de tintas y blancas (aunque existen también algunas pocas variedades rosadas), cuyos mostos son macerados, pero en menor medida que en la elaboración de un vino tinto.
- *Vino de aguja.* Debido a la variedad de la que se obtiene o de un proceso de elaboración especial, este vino conserva gran parte del gas carbónico producido en la fermentación de los azúcares. En este tipo de vino se alcanza una presión máxima de 3 atmósferas, medidas a 20 °C, por lo que el gas que se desprende no es suficiente para producir espuma.
- *Vino espumoso.* Contienen gas carbónico; sin embargo, a diferencia de los vinos de aguja, lo contienen en mayor medida debido a su proceso de elaboración ya que en ellos puede haber hasta una doble fermentación. Su característica más usual, como su nombre lo dice, es la espuma blanca y consistente que se produce al descorchar una botella de este tipo. Las variedades de uva utilizadas y su proceso de elaboración están estrictamente regulados.
- *Vino gasificado.* A diferencia de los dos tipos anteriores a estos vinos se les añade artificialmente el dióxido de carbono que contienen.
- *Vino amstelado.* Su graduación alcohólica es superior a los 13° y su contenido de materias reductoras es mayor a 100 g.

- *Vino aromatizado*. Se obtiene de un vino base al cual se le agregan diversos componentes vegetales autorizados y su graduación alcohólica es mayor a los 14°.
- *Vino chaptalizado*. Estos vinos son elaborados principalmente cuando las condiciones climáticas no han sido las favorables para una buena maduración de la uva por lo que el nivel de azúcares es bajo y se compensa añadiendo azúcares como sacarosa. El proceso de *chaptalización* es ilegal en algunas regiones, sobre todo del Viejo Mundo.
- *Vino generoso*. Son más fuertes, añejos y con altas graduaciones alcohólicas (entre 14° y 23°). Su elaboración sigue procesos muy tradicionales a partir de variedades muy selectas. (Muñoz Ramos & Ávila Granados, 2001)

### **3.1.5 Vinos tintos variedad Cabernet Sauvignon**

Esta variedad es una de las más famosas y difundidas debido a que se adapta a una gran variedad de climas, siendo especialmente resistente al viento y la sequía, es por ello que se cultiva en casi cualquier región vinícola. De origen francés y procedente de la región de Burdeos, anteriormente se creía que era una de las variedades más antiguas, derivada de las bituricas, como se denominaba al conjunto de uvas con las que elaboraban vino los romanos, pero ahora se sabe que proviene de una cruce entre las variedades Cabernet Franc y Sauvignon Blanc, que data del siglo XVII (Gerschman, 2012).

Sus vinos son perfectos para la crianza en barrica y un largo envejecimiento debido a dos grandes características; su acidez natural y alto contenido tánico proveniente de sus gruesos hollejos.

Sus bayas son pequeñas, ácidas, de un color violeta muy oscuro y piel gruesa. Sus aromas más característicos son frutos como la grosella, cereza negra y la ciruela, y hierbas. En algunos casos se tienen aromas a pimienta y menta cuya presencia se debe principalmente al clima y al nivel de exposición al sol. En boca son sedosos, de gran cuerpo y muy astringentes, esto último por su gran contenido tánico.

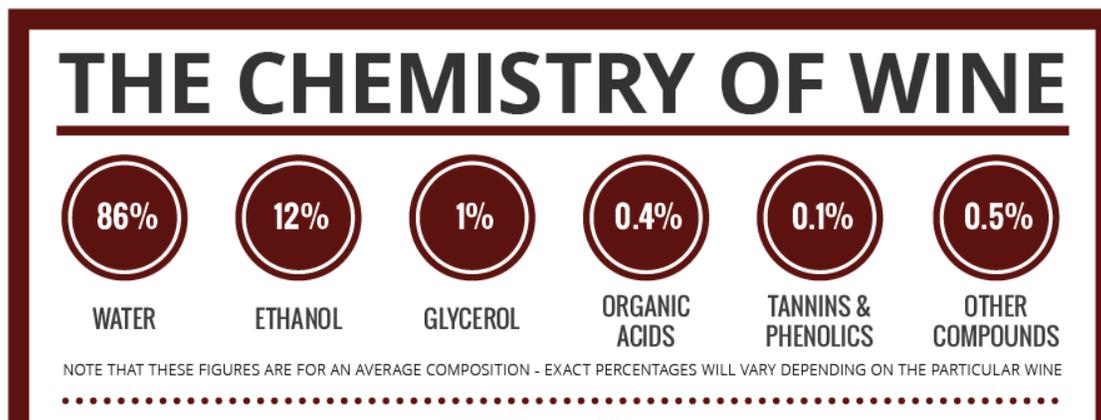
Además, es muy común que se mezcle con vinos obtenidos de otras variedades como la Cabernet Franc o Merlot. (Gerschman, 2012; Jackson, 2008)



**Figura 5.-** Racimos de uva variedad Cabernet Sauvignon.

### **3.2 Composición química del vino**

El vino es una matriz muy compleja debido a que contiene una gran cantidad de compuestos; no se puede determinar una cifra exacta, pero se tienen estimaciones que van de 800 hasta más de 1000 compuestos diferentes para un vino tinto en promedio. En general, la composición de un vino tinto está dada principalmente por agua (86%), etanol (12%), glicerol (1%), ácidos orgánicos (0.4%) y compuestos fenólicos (0.1%) (Compound Interest, 2014).



**Figura 6.-** Composición promedio para un vino tinto (Compound Interest, 2014).

Los componentes mencionados anteriormente son los componentes que se encuentran en mayor proporción, pero el vino también contiene compuestos como azúcares, pectinas, aldehídos, cetonas, ésteres, lactonas, compuestos nitrogenados, vitaminas, minerales, gases disueltos, etc., que no son menos importantes, ya que influyen de manera determinante en las características organolépticas del vino, o bien sirven para conservar dichas características (Jackson, 2008).

Sin embargo, son los azúcares, la acidez, los taninos (o compuestos fenólicos) y el grado alcohólico, los factores a los que los vinicultores prestan mayor atención para elaborar un vino con las características deseadas; por lo que hablaremos brevemente de dichos factores a continuación.

### **3.2.1 Azúcares**

Los azúcares son una categoría de los carbohidratos que se caracterizan por tener varios grupos hidroxilo (-OH) en su estructura además de un grupo aldehído o cetona (Jackson, 2008). Los azúcares simples pueden polimerizarse entre sí o con otras moléculas para formar compuestos más complejos, aunque sólo algunos de los azúcares simples presentan dulzor. Por lo tanto, dependiendo de su grado de polimerización, pueden clasificarse en monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, etc., y polisacáridos (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

Los principales azúcares en las uvas son la fructosa y glucosa, aunque llegan a contener otros, pero en cantidades insignificantes. La sacarosa, que es un disacárido de la glucosa y fructosa, raramente se produce en uvas de *Vitis vinífera*. Sin embargo, se puede llegar a encontrar en el vino como subproducto de la fermentación llevada a cabo por las levaduras (Jackson, 2008).

El contenido de azúcares es de suma importancia tanto en las uvas como en el vino ya que estos compuestos intervienen en etapas determinantes en la producción de esta bebida como, por ejemplo: el comienzo de la vendimia y la transformación del mosto en vino, es decir, la fermentación. El contenido de azúcares, como se mencionó, es un parámetro de calidad, ya que determina el contenido alcohólico, y contribuye al sabor, entre otras propiedades organolépticas del producto final (Moreno & Peinado, 2012). También son precursores de compuestos como el glicerol, el tercer componente mayoritario después del agua y etanol, el cual proporciona cuerpo y dulzor al vino (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

La concentración de azúcares es determinante en el proceso de vinificación ya que la levadura que se utiliza generalmente en este proceso, *Saccharomyces cerevisiae*, obtiene su energía metabólica principalmente de la glucosa y fructosa en el proceso de fermentación (Jackson, 2008). Por otra parte, en los vinos los azúcares que no son fermentados se denominan azúcares residuales; en este grupo podemos encontrar azúcares no fermentables como manosa, galactosa, arabinosa, ribosa, xilosa y ramnosa, y pequeñas cantidades de glucosa y fructosa no fermentadas (Jackson, 2008; Moreno-Arribas & Polo, 2009). Cabe recalcar también que, el contenido de azúcares puede aumentar ligeramente en el proceso de crianza debido a la ruptura de glucósidos contenidos en la madera de las barricas o debido a la levadura ya que, como se mencionó anteriormente, éstas pueden sintetizar y liberar azúcares al medio.

En la uva, el contenido de azúcar y la acidez están correlacionados y dependen en gran parte del clima; en climas cálidos la concentración de azúcares es mayor que la acidez mientras que en climas con bajas temperaturas la acidez será mayor que los azúcares producidos (Delanoe, Maillard, & Maisondieu, 2003). Además, las uvas

de *V. vinífera* generalmente llegan a alcanzar una concentración del 20% (m/v) o másn la madurez mientras que las uvas de otras especies, como *V. lambrusca* y *V. rotundifolia*, rara vez alcanzan esos niveles. Es por alguna de estas dos razones que los vinicultores pueden llegar a agregar azúcar, generalmente en forma de sacarosa en polvo o mezclando mostos, para alcanzar el 12% de contenido alcohólico típico para la mayoría de los vinos. A dicho proceso se le conoce como *Chaptalización* (Jackson, 2008).

### **3.2.2 Ácidos orgánicos**

Los ácidos son compuestos que se caracterizan por la ionización y liberación de iones hidronio ( $H_3O^+$ ). En los compuestos orgánicos esta propiedad está asociada principalmente con los grupos carboxilo. Su grado de ionización en el vino está determinado por diversos factores como el pH, las características individuales de cada ácido y el contenido de cationes; en particular, la presencia de potasio ( $K^+$ ) en alta concentración, puede desplazar el equilibrio ácido-base del ácido tartárico por la precipitación del tartrato ácido de potasio.

En general, los vinos blancos se caracterizan por tener un mayor contenido de acidez que los vinos tintos. En este sentido, se espera que el pH se encuentre entre 3.1 y 3.4 para la mayoría de los vinos blancos, y entre 3.3 y 3.6 para los vinos tintos (Jackson, 2008).

Los ácidos presentes en el vino provienen principalmente de dos fuentes: de la uva y de los procesos metabólicos de la levadura (Moreno & Peinado, 2012). En la viticultura, la acidez se divide en dos categorías; fija y volátil. La acidez volátil se refiere al conjunto de ácidos que pueden ser separados fácilmente de la matriz por destilación simple para después cuantificarlos haciéndolos reaccionar con una base; el ácido acético es el componente principal de la acidez volátil pero también se pueden encontrar otros ácidos carboxílicos como el ácido fórmico, propiónico y butírico (Jackson, 2008). Por otro lado, la acidez fija es aquella conformada por ácidos con pesos moleculares mayores y que por ende no se remueven por destilación; el ácido tartárico es el más importante pero también se encuentran

ácidos como el málico, láctico, succínico y pirúvico (Moreno & Peinado, 2012). En conjunto, los dos tipos de acidez conforman la acidez total o acidez titulable; este último es un término más apropiado debido a que usualmente la acidez del vino se determina por titulaciones potenciométricas en donde se da seguimiento al cambio en el pH de una alícuota al agregar una base. Esta acidez puede expresarse en diferentes formas, ya sea en términos de equivalentes de ácido acético, tartárico, málico, cítrico, láctico o sulfúrico por litro (Jackson, 2008).

El pH de un vino está determinado principalmente por la acidez fija que en mayor proporción está constituida por los ácidos tartárico y málico. Estos ácidos provienen de la pulpa de la uva; durante los procesos de maduración de la uva, así como la vinificación del mosto, sus niveles disminuyen debido a distintos procesos químicos. Por otro lado, si el vino sufre una fermentación maloláctica, el ácido málico es reemplazado por ácido láctico (Jackson, 2008).

Además de los ácidos orgánicos mencionados, el vino contiene ácidos inorgánicos como los ácidos sulfúrico y carbónico que realmente se encuentran como gases disueltos que entran en un equilibrio dinámico en disolución dando lugar a dichas especies ácidas.

El papel de la acidez es crucial en los vinos ya que ayuda a mantener un pH bajo para la estabilidad del color en los vinos tintos; a medida que el pH aumenta, las antocianinas pierden su color rojo tornándose azules. Además, el ácido tartárico es altamente resistente al ataque de bacterias y otros microorganismos comunes en el vino (Moreno & Peinado, 2012) Sumado a esto, la acidez influye también en los equilibrios de ionización de los compuestos fenólicos; un pH alto ( $\geq 3.9$ ) desplazará el equilibrio de estos compuestos a la forma disociada la cual es más susceptible a la oxidación perdiéndose así, el poder antioxidante del vino al igual que su coloración pasando de tonos rojizos y violetas a tonalidades cobrizas y turbias debido a la formación de precipitados (Jackson, 2008). La acidez es uno de los parámetros más importantes en la calidad de un vino puesto que influye de manera importante en distintas etapas del proceso de elaboración y en las propiedades organolépticas del producto final.

### **3.2.3 Alcoholes**

Los alcoholes son compuestos orgánicos que contienen uno o más grupos hidroxilo (-OH) en su estructura. Así, esta familia de compuestos se puede clasificar de acuerdo al número de grupos hidroxilo que contienen; los alcoholes simples tienen un solo grupo hidroxilo, los dioles y polialcoholes se conforman por dos o más grupos hidroxilo, respectivamente. Dentro de esta familia también encontramos a los polifenoles los cuales son compuestos cíclicos de 6 carbonos que en sus ramificaciones contienen uno o más grupos hidroxilo, pero su química es tan distinta que suelen estudiarse aparte (Jackson, 2008).

El etanol es el segundo componente mayoritario y el alcohol más importante en el vino. Como ya se ha mencionado, es el producto principal de la fermentación llevada a cabo por la levadura (Durand Guevara, 1993). Sin embargo, si se lleva a cabo lo que se conoce como maceración carbónica, que es el proceso en donde las uvas (sin prensar) experimentan una fermentación intracelular en presencia de una atmósfera de CO<sub>2</sub>, una parte del alcohol etílico provendrá de las paredes celulares de la uva.

Bajo condiciones normales para la fermentación, el contenido alcohólico puede alcanzar valores de 14-15% Alc. Vol. Los principales factores que determinan la producción de etanol durante la etapa fermentativa son el contenido de azúcares fermentables, la temperatura y el tipo de levadura utilizada. Adicionalmente, se pueden alcanzar niveles superiores en el contenido alcohólico agregando azúcar durante la fermentación; a este proceso donde el contenido alcohólico final es superior al 15% se le conoce como fortificación (Jackson, 2008).

Por otro lado, el etanol es determinante en la estabilidad y añejamiento, así como en las propiedades sensoriales del vino. El alcohol etílico inhibe el crecimiento de microorganismos que pueden ser perjudiciales, dicha propiedad, combinada con la acidez, es lo que permite que los vinos se mantengan estables durante años en ausencia de aire. Además, el alcohol también sirve como disolvente para compuestos no polares, y en el añejamiento, junto con otros alcoholes, reacciona

con los ácidos orgánicos y aldehídos para producir ésteres y acetales que son determinantes en el aroma (Jackson, 2008).

El metanol es otro constituyente alcohólico que, aunque se encuentra en niveles insignificantes, entre 0.1-0.2 g/L, su monitoreo es importante debido a que su metabolismo puede generar formaldehído y ácido fórmico los cuales son tóxicos para el consumo humano ya que pueden provocar ceguera e incluso la muerte. El metanol nunca se acumula en concentraciones tóxicas bajo procesos de elaboración legítimos. Se genera por la ruptura enzimática de pectinas, pero afortunadamente y distinto a la mayoría de las frutas, las uvas son bajas en dichos compuestos. Por lo tanto, el vino resulta ser la bebida fermentada con el menor contenido de metanol (Durand Guevara, 1993).

Los alcoholes con más de dos átomos de carbono son llamados alcoholes superiores, dichos alcoholes también se encuentran en el vino y se generan como subproductos de la fermentación, aunque también pueden provenir de la uva; el 2-etil-1-hexanol, alcohol bencílico, 2-feniletanol, 3-octanol, son algunos ejemplos de los alcoholes superiores que puede contener un vino. Dichos compuestos pueden llegar a representar alrededor del 50% de los constituyentes aromáticos (Jackson, 2008).

En los polialcoholes tenemos el glicerol que como ya se ha señalado, es el tercer constituyente mayoritario del vino. Es frecuente que los vinos tintos alcancen concentraciones superiores (~10 mg/L) a comparación de los vinos blancos (~7 mg/L). Además de ser uno de los compuestos mayoritarios es de gran importancia ya que le confiere cuerpo al vino además de aportar al dulzor (Jackson, 2008).

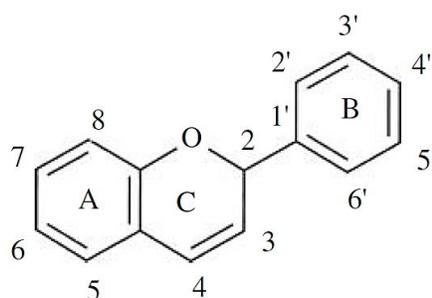
#### **3.2.4 Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos son un subgrupo de los alcoholes que presentan propiedades muy distintas a la de los alcoholes alifáticos. Esta familia de compuestos y sus derivados es tan grande y compleja que suele estudiarse por separado.

Los compuestos fenólicos o polifenoles como también se les denominan, tienen distintas propiedades que determinan gran parte de las características y calidad de los vinos tintos ya que afectan tanto en el color, aroma, sabor, sensación en boca, así como en las propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Moreno & Peinado, 2012). También son importantes en los vinos blancos, aunque en estos se encuentran en menor proporción. Principalmente son extraídos de la uva (de la piel y las semillas) aunque también se extraen pequeñas cantidades de la madera de las barricas (Jackson, 2008).

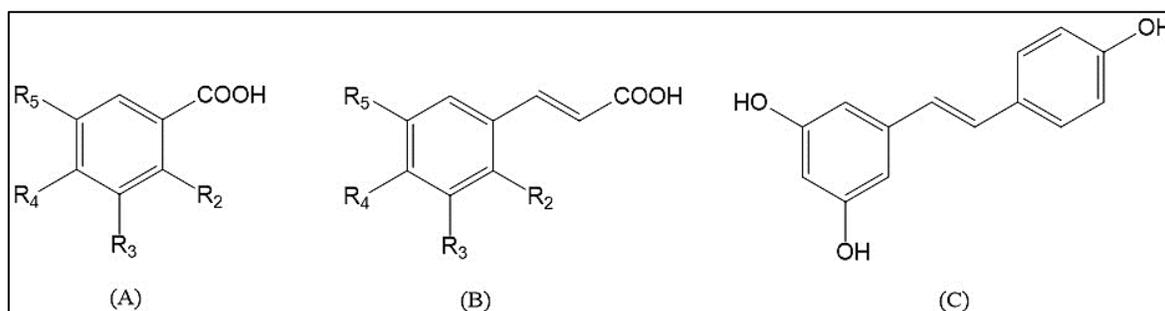
Estructuralmente son compuestos cíclicos de benceno que poseen uno o más grupos hidroxilo. Generalmente, estos compuestos se dividen en dos grandes grupos, los flavonoides (difencilpropanoides) y los no flavonoides (fenilpropanoides).

La estructura base de los flavonoides se caracteriza por un esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> que se conforma de dos anillos fenólicos (A y B) unidos por un anillo pirano central con 3 carbonos. Los tipos de flavonoides más comunes en el vino son los flavonoles, catequinas (flavan-3-oles) y las antocianinas. Además, estos compuestos se pueden encontrar no solo de manera libre sino también formando polímeros con otros flavonoles, azúcares, no flavonoides, etc. (Moreno & Peinado, 2012)



**Figura 7.-** Estructura básica de los compuestos flavonoides conformada por un esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (Jackson, 2008).

Por otro lado, los no flavonoides son estructuralmente más simples pues primordialmente, los compuestos de este tipo que se encuentran en el vino son derivados de los ácidos cinámico y benzoico además de otros derivados fenólicos como los estilbenos, por ejemplo: el resveratrol, los ácidos gálico, vanílico, salicílico, *p*-cumárico, clorogénico, caféico, entre otros. Al igual que los flavonoides, se pueden encontrar formando compuestos más complejos con azúcares, alcoholes y otros ácidos orgánicos, aunque comúnmente aparecen como ésteres con el ácido tartárico. A los polímeros de ambos tipos de compuestos fenólicos, flavonoides y no flavonoides, se les denomina genéricamente como taninos (Cervantes Díaz, 2013; Moreno & Peinado, 2012).



**Figura 8.-** Estructuras base de los ácidos benzoicos (A), ácidos cinámicos (B) y uno de los estilbenos más importantes, el *trans*-resveratrol (C). (Cervantes Díaz, 2013)

### 3.3 Clasificación del vino

La clasificación del vino es importante para dar a conocer las propiedades organolépticas, así como para el control de calidad del producto final ya que va muy relacionado con la normatividad, sobre todo en regiones con denominación de origen en donde la legislación para la producción de vino es muy rigurosa.

Existen distintas maneras de clasificar un vino, ya sea por el contenido relativo a un componente (azúcares, dióxido de carbono, alcohol), por la técnica de elaboración utilizada (vinos espumosos, vinos helados), la variedad de uva (Cabernet

Sauvignon, Tempranillo, Chardonnay) u origen geográfico (Valle de Guadalupe, Napa Valley, Borgoña). En general, podemos saber por la botella y la etiqueta información referente a los distintos tipos de clasificaciones de un vino en particular (Jackson, 2008; Muñoz Ramos & Ávila Granados, 2001; OIV, 2018).

La OIV enlista distintas maneras de clasificar un vino, pero dentro de este trabajo una de las clasificaciones de mayor interés es la relativa al contenido de azúcares que se describe a continuación.

### **3.3.1 De acuerdo al contenido de azúcares**

Dentro de esta categoría tenemos 4 tipos de vino:

- *Seco*, cuando el contenido de azúcares residuales es menor o igual a 4 g/L o 9 g/L cuando la acidez total (expresada en equivalentes de ácido tartárico) no es inferior en más de 2 g/L al contenido en azúcar.
- *Semiseco*, cuando el contenido en azúcar es mayor al punto anterior y alcanza como máximo 12 g/L o 18 g/L cuando la diferencia entre acidez total y el contenido en azúcar no supera los 10 g/L.
- *Semidulce*, cuando el contenido en azúcares es mayor al punto anterior y tiene como máximo un valor de 45 g/L.
- *Dulce*, cuando el vino tiene un contenido mínimo de azúcares de 45 g/L.

## **4 PARTE EXPERIMENTAL**

### **4.1 Generalidades**

Este trabajo se puede dividir en 3 partes; la primera es la aplicación de un método potenciométrico modificado, el cual se ha desarrollado en trabajos previos a este en el laboratorio 114 de la Facultad de Química de la UNAM, para el análisis de azúcares reductores y sacarosa invertida con base en la reacción de Fehling. Así también, se estudió el efecto de la clarificación del vino con carbón activado previo a la determinación de azúcares reductores. Finalmente, dentro de esta parte, se determinó el nivel de acidez en las muestras igualmente a través de la potencimetría. En la segunda parte se determinó la concentración de polifenoles totales en las muestras por medio del método de Folin-Ciocalteu el cual es un método fisicoquímico. Y, por último, en la tercera parte se desarrolló un nuevo método potenciométrico para la determinación de polifenoles totales en las muestras de vino.

## 4.2 Reactivos

Tabla 1.- Reactivos utilizados.

<b>Reactivo</b>	<b>Marca</b>	<b>Pureza</b>
Sulfato de cobre pentahidratado	J. T. Baker	(99.9 ± 0.1)%
Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado	J. T. Baker	(99.9 ± 0.1)%
Hidróxido de sodio (perlas)	J. T. Baker	99.3%
Ácido clorhídrico concentrado	Reproquifin	36.5%
Reactivo de Folin-Ciocalteu	Sigma-Aldrich	-*
Ácido gálico	Sigma-Aldrich	99%
Carbonato de sodio	Alcali	-*
Yodato de potasio	J.T. Baker	99.8%
Biftalato de potasio	J.T. Baker	99.95%

\*Información no reportada

## 4.3 Equipos y material

- Espectrofotómetro “Thermo Spectronic Unicam UV500”
- pH-metro “Metrohm 827”
- Balanza analítica Mettler AE 240
- Potenciómetro “Tacusel SN6”
- Electrodo de referencia de Ag/AgCl
- Electrodo de trabajo:
  - Electrodo de cobre
  - Electrodo de platino
  - Electrodo combinado de vidrio
- Parrilla de calentamiento y agitación magnética “Corning PC-420D”
- Material básico de laboratorio: vasos de precipitados, vidrio de reloj, probetas, pipetas graduadas y volumétricas, micropipetas, buretas, matraces

volumétricos, termómetro, perilla de succión, tubos de ensayo, gradilla, soporte universal, papel filtro, etc.

#### **4.4 Muestras**

Se analizaron 7 muestras de vino tinto, todas ellas de la variedad *Cabernet Sauvignon*, producidas tanto en regiones nacionales como extranjeras y se eligieron de la siguiente manera: (i) 1 marca (Finca Las Moras) de Argentina; (ii) 4 marcas (Aromo, Aromo Reservado, Emiliana y Tocornal) de Chile; y (iii) 2 marcas (Cu4tro Soles y Santo Tomas) de distintas zonas de México; Aguascalientes y Baja California, respectivamente. Dichas muestras, contenidas en botellas de vidrio, fueron adquiridas en supermercados locales y almacenadas a temperatura ambiente y fuera del alcance de la luz hasta su análisis. Previamente se trabajó con un conjunto de vinos de las mismas marcas para los análisis preliminares con el fin de encontrar experimentalmente las condiciones óptimas para cada determinación. Las determinaciones finales, de las que se muestran los resultados en esta tesis, fueron realizadas en un lapso de 5 días, realizando primeramente las determinaciones de polifenoles totales para evitar que las muestras fueran alteradas por la oxidación. Para la toma de muestras en cada determinación se hicieron extracciones de la botella con ayuda de jeringas de uso veterinario e inmediatamente después se trasvasaron a matraces Erlenmeyer y se taparon con parafilm a fin de evitar que entraran grandes cantidades de aire a la botella lo cual ocasionaría la oxidación de los polifenoles y la modificación del pH.

**Tabla 2.-** Información de las muestras de vino.

<b>Clave de la muestra</b>	<b>Nombre</b>	<b>Información</b>
V-Ar	Aromo	Vino tinto chileno con D.O. Valle del Maule. 13.5% Alc. Vol. Añada: 2017
V-ArRe	Aromo Reservado	Vino tinto chileno proveniente del Valle Central. 13% Alc. Vol. Añada: 2015
V-4S	Cu4tro Soles	Vino tinto mexicano proveniente del Valle de las Delicias. 12.5% Alc. Vol. Añada: 2018
V-Em	Emiliana	Vino tinto chileno con D.O. Valle Central. 13% Alc. Vol. Añada: 2016
V-FLM	Finca Las Moras	Vino tinto argentino proveniente del Valle de Pedernal. 13% Alc. Vol. Añada: 2018
V-ST	Santo Tomás	Vino tinto mexicano proveniente del Valle de Santo Tomás. 12.2% Alc. Vol. Añada: 2017
V-Toc	Tocornal	Vino tinto chileno proveniente del Valle Central. 12% Alc. Vol. Añada: 2018

## 5 MÉTODOS DE ANÁLISIS

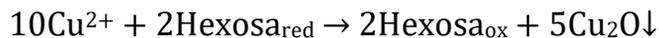
### 5.1 Pruebas a realizar

- Determinación potenciométrica de azúcares reductores residuales, glucosa más fructosa, en las distintas muestras por medio de la reacción de Fehling con disoluciones patrón preparadas a partir de reactivos de grado analítico.
- Determinación potenciométrica de sacarosa invertida igualmente a través de la reacción de Fehling con previa hidrólisis ácida de las muestras.
- Análisis del efecto de la clarificación del vino tinto con carbón activado sobre la cuantificación de los azúcares reductores residuales.
- Determinación del pH y la acidez titulable en las muestras por valoraciones potenciométricas.
- Determinación espectrofotométrica de polifenoles totales presentes en las muestras por medio del método de Folin-Ciocalteu.
- Determinación de polifenoles totales por medio de valoraciones potenciométricas, usando disoluciones de yodato de potasio como disolución patrón.

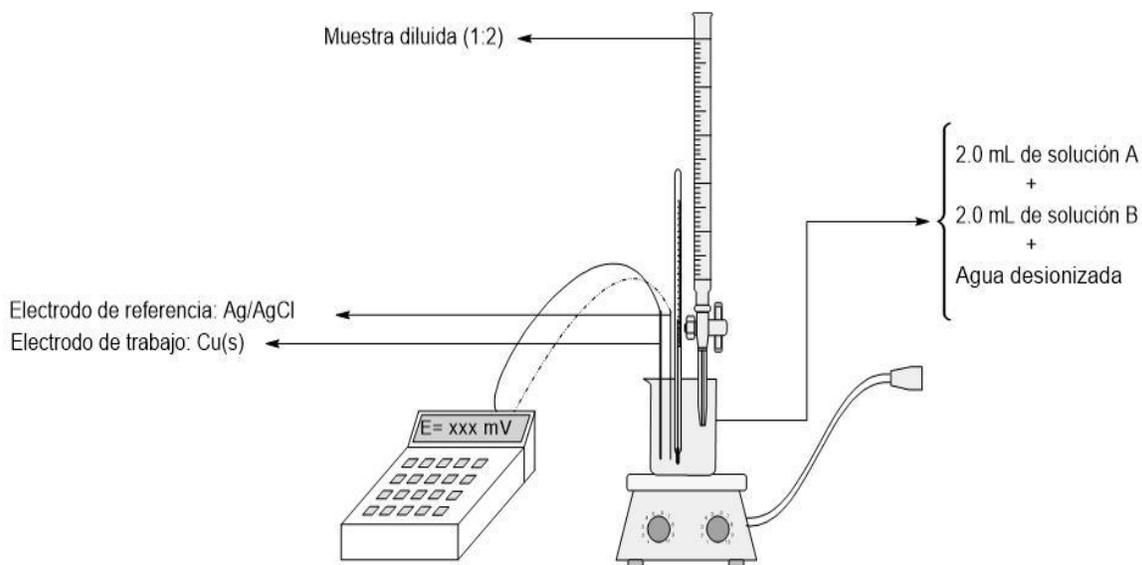
### 5.2 Determinación de azúcares reductores residuales

El vino tinto contiene distintos tipos de azúcares, pero sólo la glucosa y fructosa son las especies que presentan propiedades redox. Además, estos azúcares son los que se encuentran en mayor proporción en la uva y el mosto.

La determinación de estos azúcares se realizó por el método de Fehling modificado por Preza de la Vega y Reyes Salas (2007), el cual se basa en la capacidad que tienen los azúcares reductores, como la glucosa y fructosa, para reducir el Cu (II) a Cu (I) en el medio de Fehling (básico y con tartratos) y a una temperatura cercana a la temperatura de ebullición del agua. Se sabe que la reacción que ocurre bajo dichas condiciones entre el ion cúprico y los azúcares reductores es la siguiente:



Este método requiere de una titulación potenciométrica de la muestra con una mezcla de dos disoluciones a la cual se le conoce como *Licor de Fehling*. La disolución A es una disolución de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) mientras que la disolución B es una disolución de tartrato de sodio y potasio en medio alcalino. Antes de comenzar la titulación, las disoluciones A y B se mezclan en proporciones iguales en un vaso de precipitados, se agrega agua desionizada hasta cubrir el sistema de electrodos con el termómetro como se muestra en la figura 9; en seguida, el licor de Fehling se lleva a una temperatura de  $92\text{ }^\circ\text{C}$  aproximadamente con agitación constante y finalmente se comienza la titulación adicionando la muestra con ayuda de una bureta y midiendo el potencial.



**Figura 9.-** Esquema del montaje de material y equipo utilizado para la determinación de azúcares reductores.

La disolución de  $\text{CuSO}_4$  (disolución A), fue estandarizada por polarografía diferencial de impulsos con el método de adiciones patrón con una disolución patrón de cobre electrolítico  $0.0116 \text{ mol L}^{-1}$ , esta disolución patrón fue preparada por hidrólisis ácida de una placa de cobre metálico.

Para cada determinación se prepararon 100.0 mL de las muestras diluídas 1:2 con agua desionizada, se endulzó una bureta de 25.0 mL y posteriormente se llenó.

Por otro lado, para el licor de Fehling se utilizaron 2.0 mL de las disoluciones A y B contenidos en un recipiente cilíndrico de vidrio, se agregó suficiente agua desionizada para cubrir el sistema de electrodos de  $\text{Cu(s)}$  (trabajo) y  $\text{Ag/AgCl}$  (referencia) los cuales estaban conectados a un potenciómetro para medir el potencial conforme avanzaba la reacción. Antes de comenzar la titulación el licor de Fehling se llevó a una temperatura cercana al punto de ebullición del agua (entre  $90$  y  $92 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y manteniendo una agitación constante se procedió a comenzar la titulación de las muestras que se colocaron en la bureta de 25.0 mL.

Para cada muestra, las determinaciones se realizaron por duplicado.

### **5.3 Determinación de sacarosa**

La sacarosa es un disacárido que no presenta propiedades redox *per se*. Está compuesta de una molécula de glucosa y una de fructosa unidas por un enlace glucosídico que cuando se somete a una hidrólisis ácida o básica, dicho enlace se rompe dejando como productos sus monómeros glucosa y fructosa, los cuales sí presentan poder reductor y pueden ser analizados por el método de Fehling descrito en el punto anterior.

Por lo tanto, para la determinación de sacarosa en las muestras se utilizó el mismo procedimiento que en el apartado anterior (5.2) pero con una previa hidrólisis ácida de una alícuota de la muestra antes de ser diluída. Es decir, se tomó una alícuota de 50.0 mL de cada muestra, se vertieron en matraces volumétricos de 100.0 mL y se les añadió un exceso de ácido clorhídrico concentrado (entre 7 y 9 gotas), estas alícuotas se dejaron reposar, por lo menos, una noche. Posteriormente se procedió

a llevar a la marca de aforo con agua desionizada y finalmente se realizó la valoración potenciométrica como se indicó anteriormente. La cuantificación de azúcares reductores procedentes de sacarosa se obtiene por la diferencia entre el valor obtenido con la valoración de la muestra con hidrólisis menos el valor obtenido con la muestra sin hidrolizar.

#### **5.4 Estudio del efecto de la clarificación con carbón activado**

La reacción de Fehling se ha utilizado desde hace mucho tiempo para la determinación de azúcares reductores residuales en los vinos. La metodología que se sigue es una titulación volumétrica visual, ya que se utilizan indicadores como el azul de metileno o soluciones de almidón y con ayuda de unas tablas (tablas de Fehling) se relacionan los volúmenes gastados de las disoluciones utilizadas con el contenido de los azúcares reductores.

En este método es común que se realice una previa clarificación del vino (en el caso de los tintos y rosados) con carbón activado o acetato de plomo neutro que adsorben la materia colorante, esto para facilitar la detección del vire del indicador cuando se hace la titulación. Sin embargo, es sabido que este tipo de sustancias, adsorben la materia orgánica en general, lo cual implica que los azúcares reductores también podrían estar siendo removidos en la clarificación y, por lo tanto, los resultados obtenidos estarían sesgados del valor real.

La mayor o menor remoción de materia orgánica depende de la cantidad de carbón activado o acetato de plomo neutro que se adiciona, así como del tiempo que se deja en contacto con la muestra.

Con el método electroquímico propuesto anteriormente para la determinación de azúcares reductores se propone descartar el paso de la clarificación con carbón activado debido a que se sabe la estequiometría de la reacción entre el ion cúprico y las hexosas reductoras, la disolución de  $\text{CuSO}_4$  se estandariza y como la reacción se sigue potenciométricamente, es posible cuantificar los azúcares reductores sin la necesidad de clarificar ni utilizar el azul de metileno como indicador.

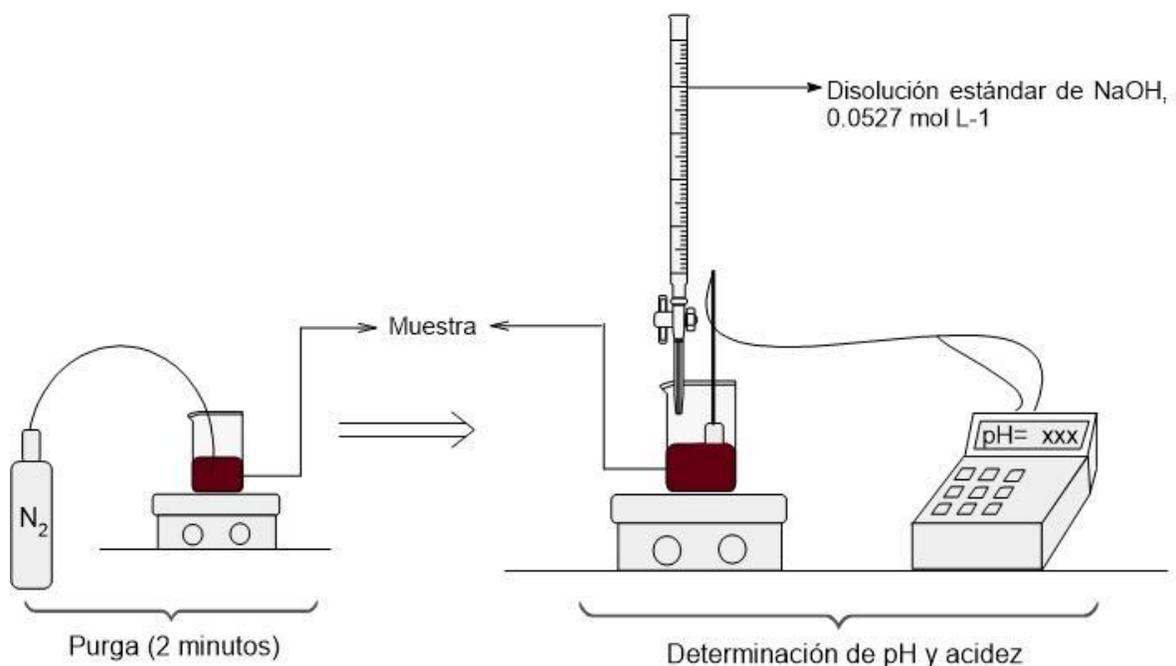
Para ello, se realizó un estudio comparativo de la determinación de azúcares reductores por medio de la reacción de Fehling. Por un lado, se prepararon las diluciones (1:2) de cada muestra y se procedió con la determinación como se menciona en el apartado 5.2. Por otro lado, antes de preparar las diluciones de las muestras, se tomaron alícuotas de aproximadamente 60 mL de cada una y se contuvieron en vasos de precipitados de 100 mL, a dichas alícuotas se agregaron aproximadamente 0.5 g de carbón activado, se mantuvo una agitación constante por 10 minutos y finalmente se filtraron para separar las muestras del carbón activado usando papel filtro Whatman No. 40. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 50.0 mL que se llevaron a matraces volumétricos de 100.0 mL, se completó hasta la marca de aforo con agua desionizada y a partir de aquí se siguieron los mismos pasos que con las muestras sin clarificar.

Los resultados obtenidos se analizan y comparan en la sección de resultados.

## **5.5 Determinación de pH y acidez**

Los equilibrios ácido-base pueden estar alterados debido a la presencia de CO<sub>2</sub> disuelto en el vino, por lo que es necesario eliminarlo. Para ello, primero se filtraron las muestras con ayuda de un embudo de vidrio poroso para la eliminación de sólidos y posteriormente se realizó una purga con N<sub>2</sub> durante 2 minutos con agitación constante para cada muestra. Inmediatamente después de la purga, se taparon los matraces donde estaban contenidas las muestras y se tomó un volumen suficiente para cubrir el electrodo combinado de vidrio del pHmetro para realizar la lectura directa del pH.

La determinación de acidez titulable se realizó de manera potenciométrica igualmente con ayuda del pHmetro y una disolución de NaOH estandarizada previamente con biftalato de potasio (KHP). En la siguiente figura se muestra el esquema de trabajo para esta determinación:



**Figura 10.-** Esquema del montaje de equipo y material para la determinación de pH y acidez.

Para cada valoración se tomaron alícuotas de 5.0 mL de cada una de las muestras previamente tratadas en un vaso de precipitados, se agregó suficiente agua desionizada para cubrir el electrodo combinado de vidrio, con agitación constante se esperó a que se estabilizara el pH inicial y finalmente se comenzó a adicionar la disolución de NaOH estandarizada por medio de una bureta al mismo tiempo que se iban trazando las curvas de valoración en la computadora.

## 5.6 Determinación de polifenoles totales por espectrofotometría

En esta determinación se utilizó el método de Folin-Ciocalteu; este es un método espectrofotométrico que se basa en la capacidad que tiene el reactivo de Folin-Ciocalteu (reactivo de F-C) para oxidar a los compuestos fenólicos contenidos en el vino. El resultado de dicha reacción es una mezcla de los óxidos de wolframio y tungsteno, posiblemente  $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$ , que presenta una coloración azul en disolución (Huang, Boxin, & Prior, 2005). La intensidad de ese color azul es

proporcional a la concentración de compuestos con poder reductor que reaccionaron con el reactivo de F-C (OIV, 2009).

Las disoluciones y el procedimiento utilizado fue el siguiente:

- Una disolución madre de ácido gálico (AG) de concentración 5000 mg L<sup>-1</sup> (0.0297 mol L<sup>-1</sup>).
- Disolución de carbonato de sodio al 20% (m/v).

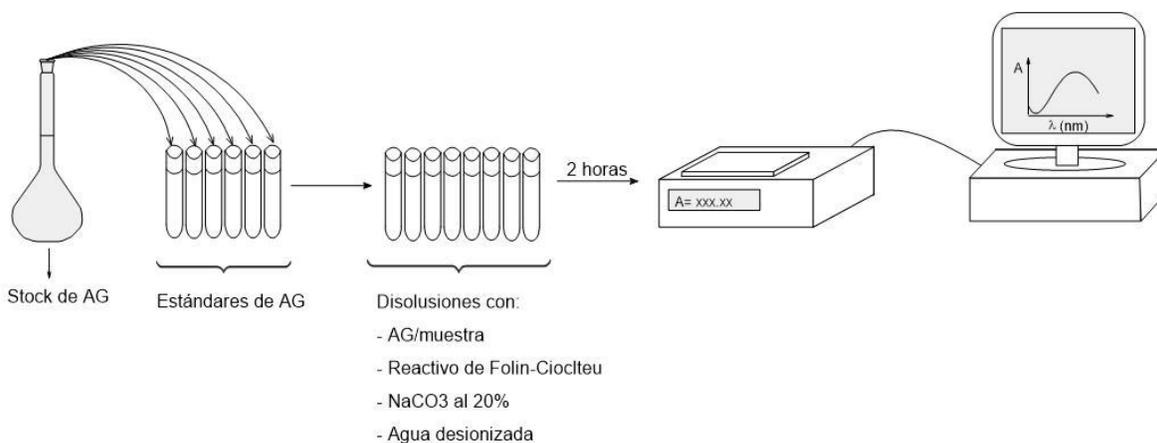
Con la disolución madre de ácido gálico se prepararon estándares de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg L<sup>-1</sup> para obtener una curva de calibración. Por su parte, las muestras se diluyeron en proporciones 1:10 con agua desionizada.

Una vez hecho todo lo anterior, se prepararon las disoluciones finales que son las que finalmente se midieron en el espectrofotómetro. Dichas disoluciones contienen la muestra diluída o el estándar, según corresponda, agua desionizada, el reactivo de F-C y la disolución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Igualmente se preparó un blanco que contenía todas las disoluciones mencionadas a excepción de la muestra y del ácido gálico.

Estas disoluciones se dejaron reposar por dos horas fuera del alcance de la luz y a temperatura ambiente. Pasadas las dos horas, se trazaron los espectros de absorción de cada disolución en un intervalo de 400 a 900 nm con ayuda de un espectrofotómetro "Thermo Spectronic Unicam UV500".

De acuerdo a los espectros obtenidos, se determinó la longitud de onda a la cual se tomaron los valores de absorbancia para la curva de calibración y las muestras.

A continuación, se ilustra el esquema de trabajo que se siguió:



**Figura 11.-** Esquema de trabajo para la determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

## 5.7 Determinación de polifenoles totales por potenciometría

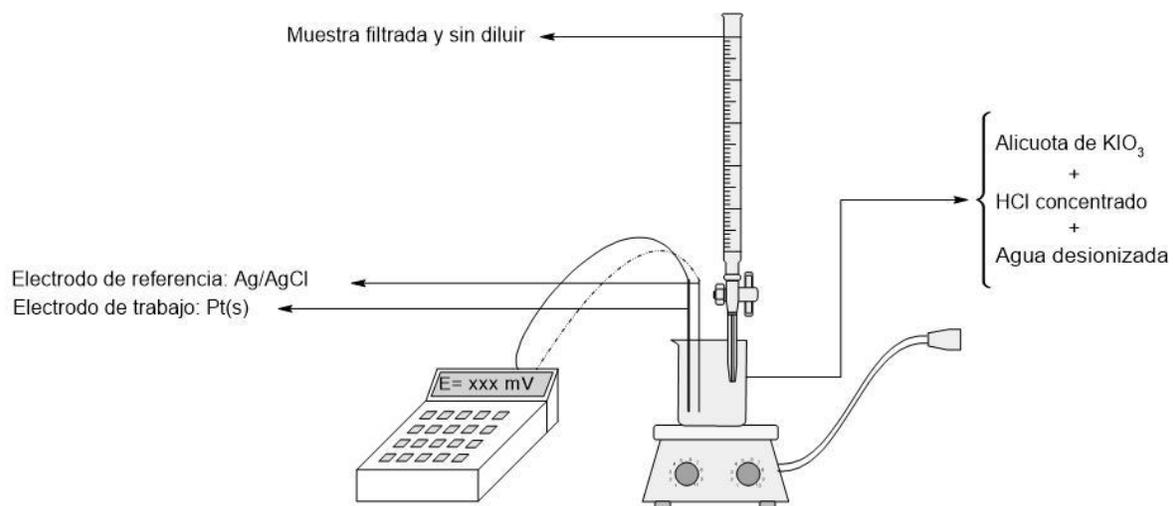
Este procedimiento se basa en la capacidad que tienen los compuestos fenólicos del vino para reducir al ion yodato ( $\text{IO}_3^-$ ) a  $\text{I}^+$  en medio ácido. Se decidió utilizar el  $\text{IO}_3^-$  por su gran solubilidad en agua, su estabilidad en disolución, su gran poder oxidante además de que es un patrón primario.

Primero se mezcla el HCl concentrado con una alícuota de yodato proveniente de una disolución patrón e inmediatamente se comienza la titulación agregando lentamente la muestra con ayuda de una bureta. La reacción se sigue por potenciometría con un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo de trabajo de Pt como se muestra en la figura 12.

En esta determinación, al igual que en la anterior, se tomó al ácido gálico como equivalente de los compuestos fenólicos.

En una primera parte se realizó un análisis electroquímico para determinar la relación estequiométrica entre el ácido gálico y el yodato, así como también la concentración óptima de ácido clorhídrico a utilizar.

En la segunda parte, con las condiciones experimentales definidas, se hizo la determinación ya con las muestras.



**Figura 12.-** Montaje de equipo y material para la determinación de compuestos fenólicos totales por vía potenciométrica.

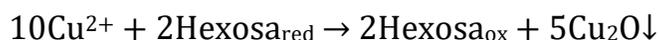
## 6 RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 6.1 Azúcares reductores residuales

Para esta determinación se prepararon las disoluciones A y B del licor de Fehling. La disolución A, de  $\text{CuSO}_4$ , se estandarizó con una disolución de  $\text{Cu}^{2+}$  electrolítico  $0.0116 \text{ mol L}^{-1}$  por polarografía diferencial de impulsos y por el método de adiciones patrón, encontrándose una concentración de  $0.3389 \text{ mol L}^{-1}$ . Para la disolución B las concentraciones fueron de  $1.2 \text{ mol L}^{-1}$  de tartrato de sodio y potasio, y de  $2.46 \text{ mol L}^{-1}$  en NaOH.

De cada muestra de vino se tomaron aproximadamente 60 mL que fueron previamente filtrados por un embudo de vidrio poroso al vacío para eliminar cualquier sustancia sólida. Posteriormente se tomaron 50.0 mL que se trasvasaron a un matraz volumétrico de 100.0 mL y se agregó agua desionizada hasta la marca de aforo; se utilizó una bureta de 25.0 mL que fue endulzada y posteriormente llenada con la muestra diluída correspondiente. Por otro lado, en un recipiente de vidrio se adicionaron de ambas disoluciones, A y B, 2.0 mL para el licor de Fehling, se agregó suficiente agua desionizada para cubrir el sistema de medición conformado por el electrodo de referencia (Ag/AgCl), el electrodo de trabajo (barra de cobre) y un termómetro; en una parrilla de calentamiento y con agitación constante, el licor de Fehling se llevó a una temperatura cercana a  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  y se procedió a agregar la muestra contenida en la bureta cuidando que la temperatura se mantuviera cercana a la temperatura de ebullición del agua.

De acuerdo con Preza de la Vega y Reyes Salas (2007), la estequiometría de la reacción de Fehling entre el ion cúprico y las hexosas reductoras es la siguiente:

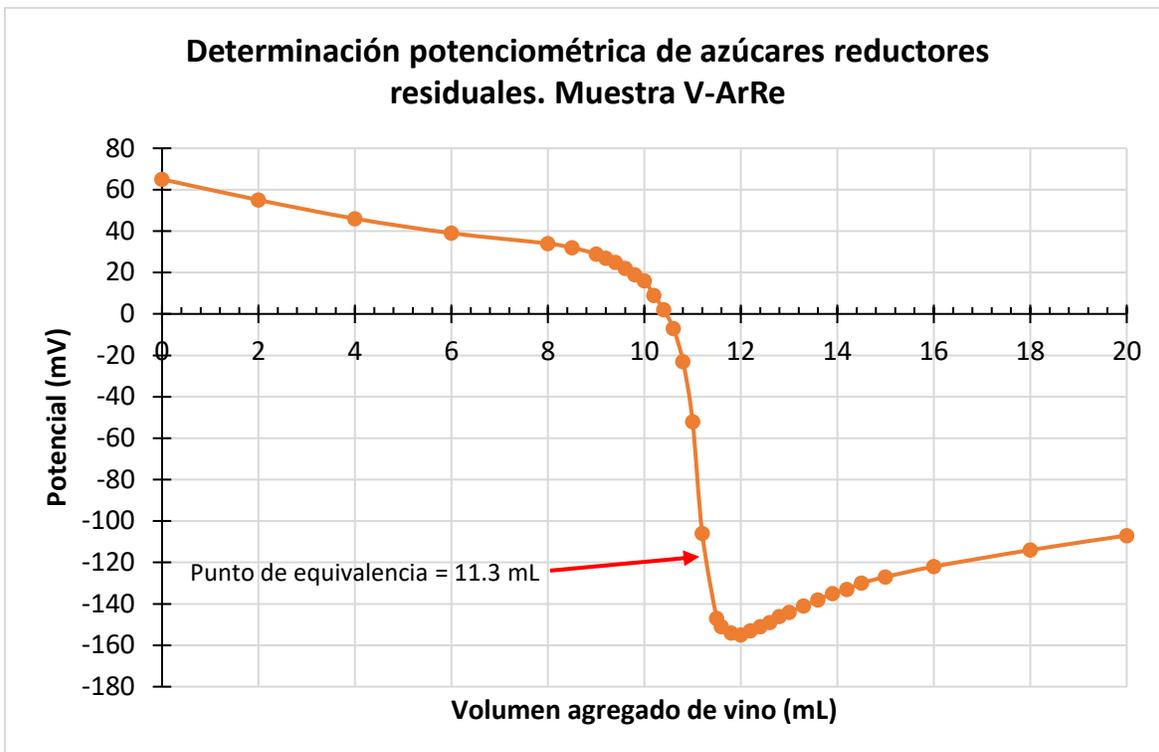


La reacción se siguió potenciométricamente, obteniendo curvas de valoración con datos experimentales de potencial y volumen agregado con los cuales se calculó el punto de equivalencia de la reacción. Para el cálculo del potencial electroquímico en el punto de equivalencia se puede deducir la siguiente ecuación, ya que se conoce la estequiometría de la reacción:

$$E_{eq} = E_{Cu(II)} - \frac{5\Delta E}{6} = E_{Az.Red.} + \frac{\Delta E}{6}$$

Es decir, que el potencial para el punto de equivalencia de la reacción de Fehling se localiza a 5/6 partes del potencial condicional inicial del ion cúprico o a 1/6 parte del potencial condicional de los azúcares reductores en la zona logarítmica de la curva de valoración.

De manera ilustrativa, se muestra la curva de valoración de la muestra de vino Aromo Reservado en la figura 13.



**Figura 13.-** Curva de la valoración potenciométrica de la muestra “Aromo Reservado” diluida 1:2 con el licor de Fehling (3.0 mL de la disolución A + 3.0 mL de la disolución B).

Para calcular el potencial al punto de equivalencia a partir de los datos experimentales se utiliza la ecuación deducida anteriormente como se muestra a continuación:

$$E_{eq} = E_{Cu(II)} - \frac{5\Delta E}{6}$$

En donde la diferencia de potenciales,  $\Delta E$ , está dada por el potencial del  $Cu^{2+} / Cu^{\circ}$  en el momento cuando el licor de Fehling llega a la temperatura cercana a la temperatura de ebullición del agua (90-93 °C) como el potencial inicial y por el potencial donde la parte baja de la curva experimental es ligeramente constante

como potencial final; ya que como se observa en la figura 13, cuando se sobrepasa el punto final de la valoración, el potencial comienza a ascender ligeramente lo cual podría corresponder a otro sistema redox, el cual queda como perspectiva para futuros estudios:

$$E_{eq.} = 65 \text{ mV} + \left( \frac{5(-154 - 65)}{6} \right) \text{ mV} = -117.5 \text{ mV}$$

De los resultados experimentales se toman dos valores de potencial; antes y después del punto de equivalencia calculado y con sus respectivos valores de volumen agregado se calcula un factor que determine matemáticamente el incremento de volumen agregado (mL) por unidad de potencial (mV) para poder calcular el volumen al punto de equivalencia:

$E_{p.e.}^*$ (mV)	$V_1$ (mL)	$E_1$ (mV)	$V_2$ (mL)	$E_2$ (mV)
-117.5	11.2	-106	11.5	-147

\*Potencial al punto de equivalencia

$$\text{Volumen agregado de la muestra}_{p.e.} = V_1 + \left[ (E_{p.e.} - E_1) \left( \frac{\Delta V}{\Delta E} \right) \right]$$

$$V_{pto.eq.} = 11.2 \text{ mL} + \left[ (-117.5 - (-106)) \text{ mV} \times \frac{(11.5 - 11.2) \text{ mL}}{(-147 - (-106)) \text{ mV}} \right] = 11.3 \text{ mL}$$

Utilizando la ecuación balanceada de la reacción y la concentración de la disolución de  $\text{CuSO}_4$ , se sabe que:

$$\text{mmol de Cu}_{\text{agregado}}^{2+} = 5 \text{ mmol de Az. Red.}_{\text{pto.eq.}}$$

$$\text{mmol de Az. Red.}_{\text{pto.eq.}} = \frac{1}{5} \text{ mmol de Cu}_{\text{agregado}}^{2+}$$

$$\text{mmol de Cu}_{\text{agregado}}^{2+} = \left( 3.0 \text{ mL} \times \frac{0.3389 \text{ mmol}}{\text{mL}} \right) = 1.0167 \text{ mmol de Cu}_{\text{agregado}}^{2+}$$

$$\text{mmol de Az. Red.}_{\text{pto.eq.}} = \frac{1.0167 \text{ mmol de Cu}_{\text{agregado}}^{2+}}{5} = 0.2033 \text{ mmol de Az. Red.}$$

$$\text{masa de Az. Red.} = 0.2033 \text{ mmol} \left( \frac{180.16 \text{ mg}}{1 \text{ mmol}} \right) = 36.6265 \text{ mg}$$

$$\text{Conc. de Az. Red.} = \left( \frac{\text{masa de Az. Red.}}{V_{\text{pto.eq.}}} \right) \left( \frac{V_{\text{dilución}}}{V_{\text{muestra}}} \right)$$

$$\text{Conc. de Az. Red.} = \left( \frac{36.6265 \text{ mg}}{11.3 \text{ mL}} \right) \left( \frac{100.0 \text{ mL}}{50.0 \text{ mL}} \right) = 6.4825 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} = 6.48 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

De la misma manera se calculó la concentración de azúcares reductores para todas las muestras.

Los resultados obtenidos aparecen en la tabla 3 así como la clasificación a la cual pertenecerían acorde al nivel de dichos azúcares según la OIV.

**Tabla 3.-** Contenido de azúcares reductores en las muestras determinados por la reacción de Fehling y su clasificación de acuerdo a la OIV.

<b>Muestra</b>	<b>Volúmenes de las disoluciones A y B</b>		<b>Volumen agregado de la muestra al p.e.*</b> <b>(mL)</b>	<b>[Azúcares Reductores] (g/L)</b>	<b>Tipo de vino (OIV)</b>
V-Ar	2.0	2.0	8.3	5.80	Semiseco
V-ArRe	3.0	3.0	11.3	6.48	Semiseco
V-4S	2.0	2.0	14.6	3.34	Seco
V-Em	2.0	2.0	9.8	4.97	Semiseco
V-FLM	2.0	2.0	7.7	6.34	Semiseco
V-ST	2.0	2.0	13.8	3.55	Seco
V-Toc	3.0	3.0	10.6	6.93	Semiseco

\*Punto de Equivalencia

Los volúmenes utilizados del licor de Fehling ( 2 y 3 mL) se eligieron con base en los volúmenes gastados de las muestras para alcanzar el punto final de la valoración.

Como se puede apreciar, la mayoría de los vinos resultaron ser semisecos de acuerdo a la clasificación utilizada y sólo dos de ellos son secos. Esto quiere decir que probablemente los productores no realizaron el proceso de fermentación de forma completa o que, en un paso posterior a la fermentación, se adicionó sacarosa o mosto sin fermentar o que el contenido de azúcares aumentó en la crianza en barricas debido al rompimiento de glucósidos presentes en la madera de estas. Desde luego, también puede deberse a la naturaleza de las uvas y de los fermentos.

Por otro lado, resulta interesante el comportamiento de la curva experimental después del punto de equivalencia de la valoración ya que en todos los casos se observa un ligero ascenso del potencial después de dicho punto. Esto puede ser provocado por reacciones desconocidas pero que igualmente son del tipo redox. Además, hay que considerar que uno de los productos de la reacción de Fehling es  $\text{Cu}_2\text{O}$  que termina recubriendo al electrodo de trabajo y que el vino es una mezcla de etanol-agua, dichas condiciones también influyen en el comportamiento del potencial. El vino es una matriz muy compleja por lo que este fenómeno queda expuesto para estudiarse en trabajos posteriores.

## **6.2 Sacarosa invertida**

Para este parámetro se realizó previamente una hidrólisis ácida de la muestra con el fin de romper las moléculas de sacarosa (en caso de que la muestra contenga dicho compuesto) en sus monómeros, glucosa y fructosa. Para ello se extrajo un volumen de aproximadamente 60 mL de cada muestra, se filtró al vacío por medio de un embudo de vidrio poroso, se tomaron 50.0 mL que fueron adicionados a un matraz volumétrico de 100.0 mL y se les agregó un exceso de HCl concentrado, se mezcló bien y se dejó reposando por una noche. Al día siguiente se completó el

volumen de los 100.0 mL con agua desionizada. Esta disolución se agregó a la bureta de 25.0 mL y se procedió a realizar la determinación de azúcares reductores por medio del método de Fehling ya descrito.

Los cálculos realizados fueron idénticos a los de la determinación de azúcares reductores y para conocer el contenido de sacarosa invertida simplemente se restó el valor obtenido de la muestra sin hidrolizar del resultado de esta determinación. Los resultados se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4.-** Contenido de sacarosa invertida en las muestras determinada por la reacción de Fehling con previa hidrólisis ácida.

<b>Muestra</b>	<b>[Azúcares Reductores] (g/L)</b>	<b>[Azúcares Reductores + Sacarosa Invertida] (g/L)</b>	<b>[Sacarosa Invertida] (g/L)</b>
V-Ar	5.80	5.96	0.16
V-ArRe	6.58	6.83	0.25
V-4S	3.34	3.40	0.06
V-Em	4.97	5.11	0.14
V-FLM	6.34	6.49	0.15
V-ST	3.55	3.63	0.08
V-Toc	6.93	6.94	0.01

Los resultados de sacarosa son muy bajos, casi despreciables como en las muestras V-4S y V-Toc, estas cantidades pueden provenir de los distintos procesos naturales de la vid y/o de los subproductos de la fermentación llevada a cabo por las levaduras.

El método utilizado para esta determinación tiene dos factores a considerar muy importantes:

- El grado de la hidrolisis previa con HCl está condicionado cinéticamente ya que no es lo mismo dejar en contacto la muestra con el ácido por unas cuantas horas o por toda una noche (12-15 horas).

- La cantidad de HCl no debe ser excesiva ya que una concentración muy alta de ácido puede modificar el equilibrio del complejo de tartrato con el NaOH que se encuentra en el licor de Fehling al momento de realizar la determinación. Dicho complejo es el que permite que el Cu (II) se reduzca a Cu (I) para generar el  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Si se modifica dicho equilibrio, la determinación podría ser errónea.

Por último, se puede decir que, debido a los bajos niveles de sacarosa encontrados, estos vinos no sufrieron un proceso de *chaptalización*.

### **6.3 Efecto de la clarificación con carbón activado**

Se compararon los resultados de la determinación de azúcares reductores por medio de la reacción de Fehling obtenidos con las muestras clarificadas con carbón activado y sin clarificar. Para las muestras sin clarificar se siguió la metodología descrita en el apartado 6.1. Para las muestras clarificadas se extrajeron alrededor de 60 mL de cada vino, se depositaron en un vaso de precipitados de 250 mL, se adicionaron 0.5 g de carbón activado y se mantuvo en agitación por 10 minutos para posteriormente filtrar al vacío con papel filtro marca Waltman No. 40. Una vez realizado este pretratamiento de la muestra se continuó como se hizo con las muestras que no fueron clarificadas, las determinaciones se hicieron por triplicado. Los resultados de este estudio se muestran a continuación:

**Tabla 5.-** Determinación de azúcares reductores en muestras sin clarificar y clarificadas con carbón activado por medio de la reacción de Fehling.

<i>Vino</i>	<i>Sin clarificar</i>	<i>Clarificado</i>	<b>Porcentaje de materia orgánica removida</b>
	<b>[Azúcares Reductores] (g/L)</b>	<b>[Azúcares Reductores] (g/L)</b>	
V-Ar	5.72 ± 0.45	4.86 ± 0.11	15.03 %
V-ArRe	5.06 ± 0.07	4.27 ± 0.01	15.61 %
V-4S	4.96 ± 0.12	4.06 ± 0.15	18.15 %
V-FLM	7.65 ± 0.14	7.08 ± 0.02	7.45 %
V-RV	3.92 ± 0.25	3.09 ± 0.06	21.17 %
V-ST	5.37 ± 0.04	4.87 ± 0.13	9.31 %
V-Toc	9.34 ± 0.61	8.72 ± 0.04	6.64 %

Los valores presentados en la tabla 5 son los obtenidos en las pruebas preliminares con el primer conjunto de muestras. Como se puede observar, a pesar de la clarificación se obtienen resultados con una mínima diferencia respecto a aquellos donde no se utilizó el carbón activado, siendo tan mínima dicha diferencia que no repercute en el tipo de vino, según la OIV, de acuerdo a la concentración de azúcares residuales. Esta diferencia podría deberse en gran medida a que la clarificación busca remover la materia colorante del vino que en este caso son las antocianinas, principalmente, mismas que se encuentran en proporciones muy bajas de concentración. Estos compuestos pueden reaccionar con el licor de Fehling ya que también poseen propiedades reductoras, pero como se encuentran en concentraciones muy bajas y además con el método propuesto no es necesario un indicador visual, se concluyó que no es necesaria la clarificación. Además, la clarificación previa podría remover una parte de los azúcares dando resultados erróneos ya que el carbón activado no es específico para las antocianinas, sino que en general adsorbe la materia orgánica, esto depende del tiempo en que se realice

la agitación de la muestra con el carbón activado, a mayor tiempo de contacto entre la matriz y el carbón activado, mayor cantidad de materia orgánica removida.

#### 6.4 Acidez y pH

Para la medición del pH se hizo un pretratamiento de la muestra ya que en la mayoría de los métodos para la determinación de la acidez titulable no se toma en cuenta el CO<sub>2</sub> disuelto; se extrajeron aproximadamente 10 mL de cada muestra los cuales fueron filtrados al vacío a través de un embudo de vidrio poroso; posteriormente, se purgó cada muestra burbujeando N<sub>2</sub> durante 2 minutos con agitación constante para eliminar el CO<sub>2</sub> que pudieran contener los vinos pudiendo afectar los equilibrios ácido-base; finalmente se introdujo al vaso con la muestra un electrodo de vidrio combinado el cual estaba conectado a un pHmetro “Metrohm 827”. Una vez que se estabilizó el valor de pH se registró dicho parámetro para cada muestra; los resultados se encuentran en la tabla 6.

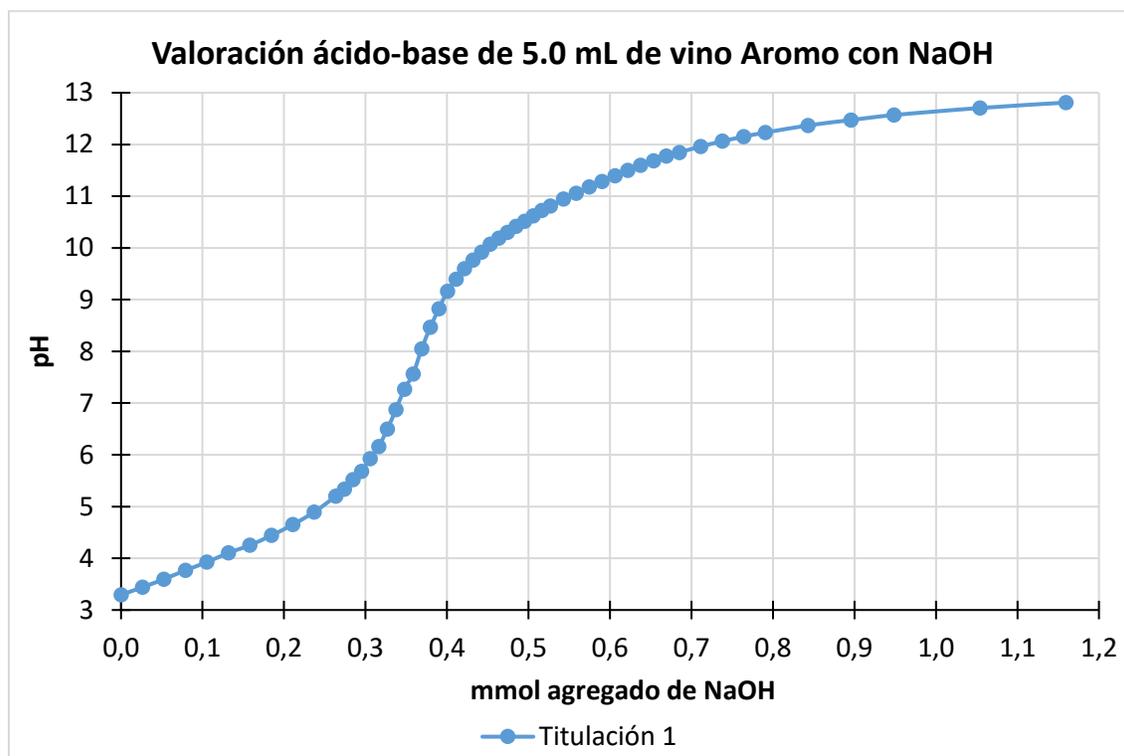
**Tabla 6.-** Resultados de la medición del pH en las muestras.

<i><b>Muestra</b></i>	<i><b>Clave</b></i>	<i><b>pH</b></i>
Aromo	V-Ar	3.474
Aromo Reservado	V-ArRe	3.455
Cu4tro Soles	V-4S	3.822
Emiliana	V-Em	3.614
Finca Las Moras	V-FLM	3.529
Santo Tomás	V-ST	3.674
Tocornal	V-Toc	3.431

Los valores de pH se encuentran dentro de los valores esperados para un vino tinto (entre 3.3 y 3.7). La utilidad de este parámetro nos sirve principalmente para asegurar que no haya proliferación de microorganismos en el vino y, por lo tanto, se mantenga estable hasta su consumo.

Para la acidez se realizaron valoraciones potenciométricas de las muestras con una disolución de NaOH estandarizada con biftalato de potasio como patrón primario.

Dicha disolución de NaOH, preparada en el laboratorio, resultó tener una concentración de  $0.0527 \text{ mol L}^{-1}$ . Una vez estandarizada la disolución de NaOH, se llenó una bureta de 25.0 mL con esta solución, mientras que de las muestras previamente tratadas se tomaron alícuotas de 5.0 mL en vasos de precipitados de 50 mL, se adicionó suficiente agua desionizada para cubrir el electrodo combinado de vidrio y se mantuvo una agitación constante con ayuda de una barra magnética y una parrilla de agitación; la titulación comenzó una vez que el pH inicial se estabilizó. Antes de las determinaciones, el pHmetro se calibró con disoluciones tampón de pH 4, 7 y 10. A continuación se muestra una de las curvas obtenidas experimentalmente para la muestra de vino Aromo a manera de ejemplo:



**Figura 14.-** Determinación de la acidez titulable en una alícuota de 5.0 mL de vino “Aromo” con una disolución patrón de NaOH  $0.0527 \text{ mol L}^{-1}$ .

La acidez de un vino se debe a varios componentes como el ácido tartárico, málico, acético, cítrico, etc. Estos tipos de ácidos son de naturaleza orgánica y de fuerza débil. En la literatura se pueden encontrar distintos métodos para la determinación de la acidez titulable (AT) en vinos; la OIV propone dentro de sus métodos de análisis tomar el volumen de NaOH agregado donde el pH es igual a 7.0 como punto final de la titulación aunque esa consideración sólo sería válida para la valoración de un ácido fuerte con una base fuerte lo cual, evidentemente, no es así en el sistema de estudio en cuestión; la Asociación de Colaboración Analítica Oficial (AOAC por sus siglas en inglés) propone un pH de 8.2 como punto final aunque a valores de pH tan grandes se han encontrado problemas como la saponificación de ésteres, la hidrólisis del complejo aldehído-bisulfito, entre otros (Joslyn y Amerine, 1964); otros estudios sugieren que el punto final se encuentra a pH 7.7 (Wong, G. y Caputi, A., 1966).

Por otro lado, aunque la acidez titulable se conforme de los mismos ácidos, esto no quiere decir que se encuentran en las mismas proporciones y tomar como punto final de la titulación un solo valor de pH para cualquier vino no sería lo más sensato. Es por ello que en este trabajo se decidió recurrir al método gráfico de la primera derivada para determinar el pH al punto de equivalencia para cada una de las muestras. Como estudio comparativo, de los datos experimentales se tomaron aquellos correspondientes a los valores de pH sugeridos por los métodos descritos anteriormente.

Los resultados se obtuvieron como miliequivalentes por litro y como gramos de ácido tartárico por litro. Tomando como ejemplo los datos de volumen de NaOH gastado para el vino "Emiliana" correspondientes al punto final a los distintos valores de pH y el determinado por la primera derivada, se prosiguió de la siguiente manera para realizar los cálculos:

$$\text{mmol de } OH^- = [NaOH] \left( \frac{\text{mmol}}{\text{mL}} \right) * \text{volumen gastado de NaOH al punto final (mL)}$$

$$\text{mmol de } OH^- = \text{miliequivalentes de } OH^- = \text{miliequivalentes de } H^+$$

$$\text{Acidez titulable} = AT \left( \frac{\text{meq}_{H^+}}{L} \right) = \left( \frac{n \text{ meq}_{H^+}}{\text{Volumen de la muestra (mL)}} \right) * \left( \frac{1000 \text{ mL}}{L} \right)$$

$$AT = \left( \frac{0.374 \text{ meq}_{H^+}}{5.0 \text{ mL}} \right) * \left( \frac{1000 \text{ mL}}{L} \right) = 74.80 \frac{\text{meq}_{H^+}}{L}$$

$$AT \left( \frac{\text{g}_{\text{ác.tartárico}}}{L} \right) = AT \left( \frac{\text{meq}_{H^+}}{L} \right) * \left( \frac{1 \text{ mmol}_{\text{ác.tartárico}}}{2 \text{ meq}_{H^+}} \right) * \left( \frac{1 \text{ mol}}{1000 \text{ mmol}} \right) * \left( \frac{150 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \right)$$

$$AT \left( \frac{\text{g}_{\text{ác.tartárico}}}{L} \right) = AT \left( \frac{\text{meq}_{H^+}}{L} \right) * 0.075$$

$$AT \left( \frac{\text{g}_{\text{ác.tartárico}}}{L} \right) = \left( 74.80 \frac{\text{meq}_{H^+}}{L} \right) * 0.075 = 5.61 \frac{\text{g}_{\text{ác.tartárico}}}{L}$$

Así pues, los resultados para la acidez titulable de cada vino se muestran en las tablas 7 y 8, respectivamente:

**Tabla 7.-** Resultados de acidez titulable expresada como miliequivalentes determinados por el método de la 1ra derivada y , como indican otras metodologías, a distintos valores de pH.

Muestra	V <sub>alícuota</sub> (mL)	[meq/L] <sup>1D</sup> *	[meq/L] (pH=7.0)**	[meq/L] (pH=7.7)***	[meq/L] (pH=8.2)****
Aromo Reservado	5.0	69.60 (pH= 8.16)	63.24	67.46	69.56
Aromo	5.0	73.80 (pH= 8.05)	69.56	71.67	75.89
Cu4tro Soles	5.0	76.80 (pH= 8.29)	65.35	68.51	70.62
Emiliana	5.0	74.80 (pH= 8.35)	65.35	69.56	73.78
Finca Las Moras	5.0	83.20 (pH= 8.79)	75.89	80.10	82.21
Santo Tomás	5.0	79.00 (pH= 8.08)	75.89	80.10	82.21
Tocornal	5.0	77.40 (pH= 8.78)	69.56	73.78	79.05

\*Calculado con los datos del método de la primera derivada (1D)

\*\*Considerando como punto final el pH= 7.0 (Método de la OIV)

\*\*\*Considerando como punto final el pH= 7.7 (Método de Wong)

\*\*\*\*Considerando como punto final el pH= 8.2 (Método de AOAC)

**Tabla 8.-** Resultados de acidez titulable expresada como gramos de ácido tartárico determinados por el método de la 1ra derivada y a distintos valores de pH.

Muestra	V <sub>alícuota</sub> (mL)	g <sub>tartárico</sub> /L <sup>1D*</sup>	g <sub>tartárico</sub> /L (pH=7.0)**	g <sub>tartárico</sub> /L (pH=7.7)***	g <sub>tartárico</sub> /L (pH=8.2)****
Aromo Reservado	5.0	5.22	4.74	5.06	5.22
Aromo	5.0	5.54	5.22	5.38	5.69
Cu4tro Soles	5.0	5.76	4.90	5.14	5.30
Emiliana	5.0	5.61	4.90	5.22	5.53
Finca Las Moras	5.0	6.24	5.69	6.01	6.17
Santo Tomás	5.0	5.93	5.69	6.01	6.17
Tocornal	5.0	5.81	5.22	5.53	5.93

\*Calculado con los datos del método de la primera derivada (1D)

\*\*Considerando como punto final el pH= 7.0 (Método de la OIV)

\*\*\*Considerando como punto final el pH= 7.7 (Método de Wong)

\*\*\*\*Considerando como punto final el pH= 8.2 (Método de AOAC)

Como es de esperar, la cantidad de protones valorados (relacionada con la acidez de la muestra de vino) varía cuando se toma como punto final de la titulación distintos valores de pH. Así pues, se cuantifica una mayor acidez si el punto de equivalencia se toma a pH=8.2 que si se hace a pH=7.0 aunque ninguno de los dos criterios asegura que dicho valor sea el pH al punto final o punto de equivalencia, es decir, cuando se ha agregado una cantidad de base equivalente a la cantidad de protones H<sup>+</sup> provenientes de los ácidos. El pH al punto de equivalencia en estos sistemas nunca será igual a 7.0 debido a que no se está titulando un ácido fuerte con una base fuerte, como ya se mencionó. El sistema es un conjunto de ácidos débiles valorados con una base fuerte; en este caso el pH al punto de equivalencia está determinado por los valores de p<sub>k<sub>a</sub></sub> y las concentraciones de las bases conjugadas solas, de acuerdo a la ecuación:

$$pH = 7 + \frac{1}{2}pk_a + \frac{1}{2}\log [\text{base conjugada}]$$

Por otro lado, se puede apreciar que no se obtiene una curva con la típica forma sigmoideal, sino que el pH en la zona después del punto final se encuentra deformado. Este comportamiento puede deberse a reacciones acopladas como la

saponificación de ésteres y/o la hidrólisis de complejos como el bisulfito-aldehído que tienen lugar a valores de pH alcalinos. Así como también a la ionización de compuestos como las lactonas que se encuentran en un equilibrio entre la forma cíclica y de cadena abierta y al realizar la valoración dicho equilibrio se ve desplazado. Este tipo de reacciones acopladas pueden estar gobernadas por aspectos cinéticos y es por ello que el salto de pH no es totalmente vertical.

Al comparar los valores obtenidos tomando como punto final un pH específico y aquellos obtenidos por el método gráfico se observa que se encuentran en el mismo intervalo de concentraciones y si se ordenan de forma ascendente sólo cambia la posición de uno que otro vino. La calidad de un vino es única (aunque comparable) por lo que su caracterización también debería ser así, es por ello que en este trabajo se propone determinar el punto de equivalencia de las titulaciones ácido-base para cada vino y con el pHmetro. Adicionalmente, el uso del método gráfico nos brinda mayor información acerca de lo que pasa al momento de realizar la valoración y con ello se puede entender de mejor forma los procesos que se llevan a cabo en una matriz tan compleja.

Las determinaciones de acidez realizadas en este trabajo confirman la necesidad de emplear un pHmetro. Los artículos y normas, aún cuando sean internacionales, deberán modificarse para que las determinaciones correspondan a la realidad; algunas normas empleadas en otros países indican el empleo de indicadores coloreados (como el azul de bromotimol o la fenolftaleína) pero es evidente que no pueden ser empleados en el caso de vinos tintos.

## **6.5 Polifenoles totales por espectrofotometría**

Esta determinación se basa en una técnica fisicoquímica y en la capacidad que tienen los compuestos polifenólicos para reducir al reactivo de F-C. Todas las disoluciones utilizadas se prepararon en el laboratorio excepto el reactivo de Folin-Ciocalteu que fue adquirido a través de Sigma-Aldrich®. Se preparó una disolución madre de ácido gálico de 5000 mg L<sup>-1</sup> (0.0297 mol L<sup>-1</sup>); en un matraz volumétrico de

50.0 mL se disolvieron 0.2525 g de ácido gálico con agua desionizada y se llevó a la marca de aforo. Esta disolución se guardó en un frasco color ámbar y en refrigeración.

También se preparó una disolución de carbonato de sodio al 20% (m/v); se pesó aproximadamente 40 g de carbonato de sodio anhidro y se disolvieron en 150 mL de agua desionizada y se llevó a ebullición por 5 minutos con agitación constante. Después de enfriarse a temperatura ambiente, se agregaron unos cuantos cristales y se dejó reposar por una noche. Finalmente se filtró y se completó el volumen a 200 mL.

Para la curva de calibración, en matraces volumétricos de 10.0 mL se prepararon disoluciones estándar de ácido gálico, como se muestra en la tabla 9, agregando los volúmenes correspondiente de la disolución madre con una micropipeta y llevando a la marca de aforo con agua desionizada.

**Tabla 9.-** Composición y concentración de los estándares de ácido gálico.

STD*	Vol. Stock (µL)	Vol. Stock (mL)	Vol dilución (mL)	[AG] (mg L <sup>-1</sup> )
1	200.0	0.2	10.0	100.0
2	400.0	0.4	10.0	200.0
3	500.0	0.5	10.0	250.0
4	600.0	0.6	10.0	300.0
5	800.0	0.8	10.0	400.0
6	1000.0	1	10.0	500.0

\*STD: Estándar

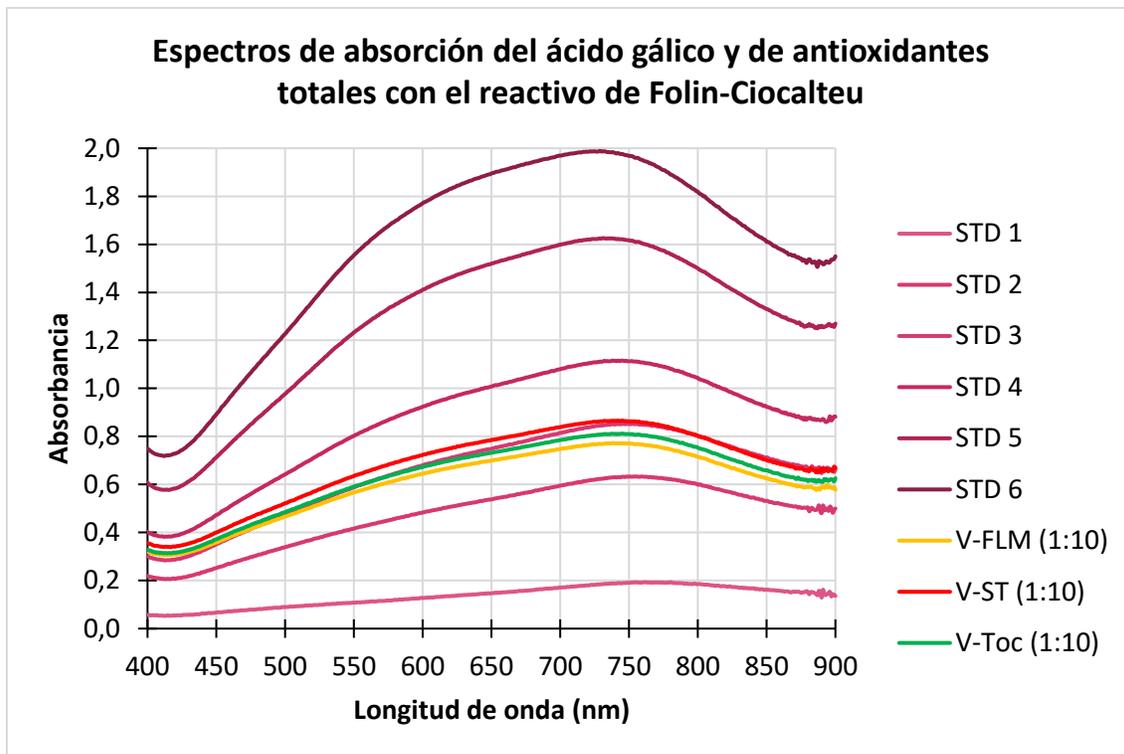
Una vez preparados los estándares, se extrajeron aproximadamente 15 mL de las botellas de cada muestra, se filtraron y se prepararon 50.0 mL de diluciones 1:10 con agua desionizada. Enseguida, en matraces volumétricos de 10.0 mL se adicionaron 500.0 µL de cada estándar o de cada muestra, según correspondiera, más 7.0 mL de agua desionizada, mezclando homogéneamente; después, se siguió

con la adición de 500.0  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu en cada matraz y se agitó cada disolución por aproximadamente 30 segundos; antes de 8 minutos desde la adición del reactivo de Folin-Ciocalteu se agregaron 1.5 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20% (m/v), mezclando de manera homogénea y finalmente completando el volumen con agua desionizada. Igualmente se preparó un blanco con los mismos componentes pero sin la adición de ácido gálico o muestra. Estas disoluciones se dejaron reposar por un lapso de 2 horas a temperatura ambiente.



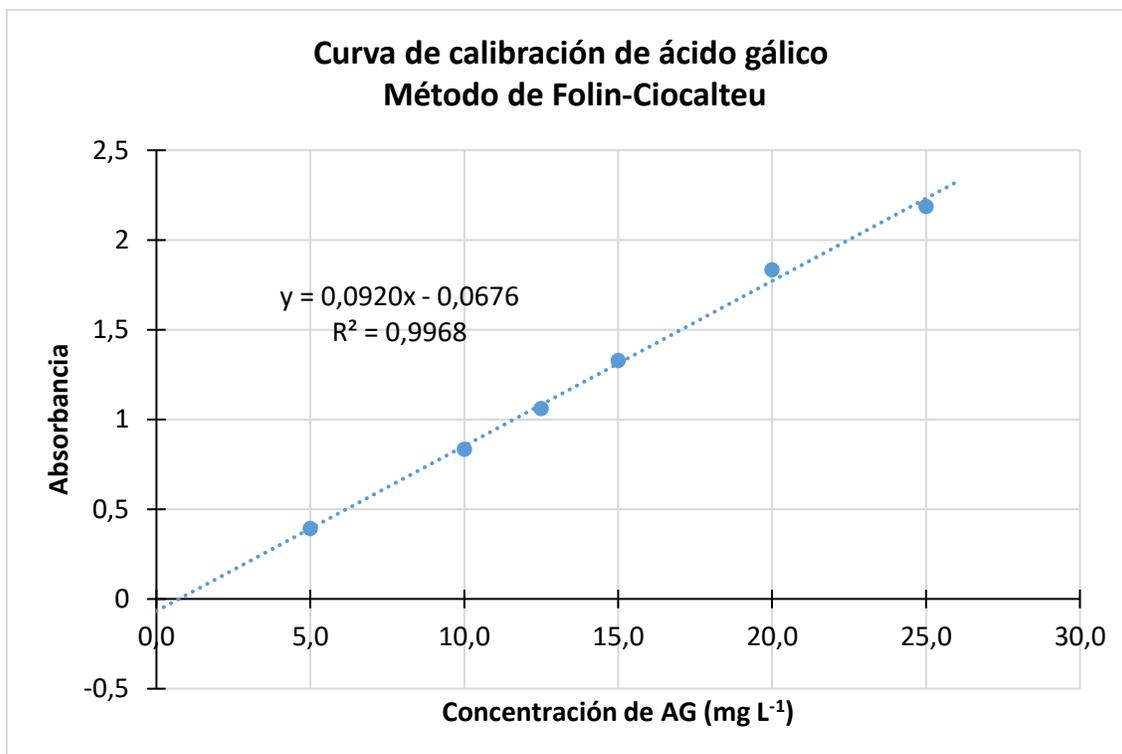
**Figura 15.-** Disoluciones de los estándares de ácido gálico y las muestras preparadas con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Del lado izquierdo se tienen las disoluciones recién preparadas (amarillas) y del lado derecho se aprecia el cambio de coloración (azul) después de las 2 horas de reposo.

Una vez pasado el tiempo de reposo se procedió a realizar las lecturas de absorbancia para el trazado de los espectros de absorción de cada disolución para observar experimentalmente los picos de absorbancia tanto del ácido gálico como de las muestras (figura 16). En la literatura varios autores han reportado que la medición de la absorbancia en este método se debe realizar a una longitud de onda entre 750 y 765 nm.



**Figura 16.-** Espectros de absorción de los estándares de ácido gálico y de las muestras diluidas 1:10 preparados con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

De acuerdo a los espectros obtenidos, para la curva de calibración se decidió hacer la medición de la absorbancia a 745 nm que es la longitud de onda donde la variación de la absorbancia es mínima. La curva que se obtuvo se muestra a continuación:



**Figura 17.-** Curva de calibración de los estándares de ácido gálico midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 745 nm.

Los cálculos para las concentraciones finales del ácido gálico en las disoluciones preparadas con el reactivo de Folin-Ciocalteu se muestran enseguida con los datos del estándar 3 como ejemplo.

Para la concentración del estándar a partir de la disolución stock:

$$[AG^*]_{STD\ 3} = \frac{[AG]_{stock} \times Vol_{aliquota}}{Vol_{dilución}} = \frac{(5000\ mg\ L^{-1}) \times (0.5\ mL)}{10.0\ mL} = 250.0\ mg\ L^{-1}$$

\*AG: Ácido Gálico

Para la concentración de ácido gálico en la disolución 3 preparada con el reactivo de Folin-Ciocalteu:

$$[A. G.] = \frac{[A. G.]_{STD 3} \times Vol_{aliquota}}{Vol_{dilución}} = \frac{(250.0 \text{ mg L}^{-1}) \times (0.5 \text{ mL})}{10.0 \text{ mL}} = 12.5 \text{ mg L}^{-1}$$

Así pues, las concentraciones finales del ácido gálico en las disoluciones preparadas con el reactivo de F-C, así como sus respectivas absorbancias se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 10.-** Concentraciones finales de ácido gálico y algunas muestras con sus respectivas absorbancias medidas a 745 nm.

<i>Disolución</i>	<i>[AG] mg L<sup>-1</sup></i>	<i>A<sup>745</sup></i>
STD 1	5.0	0.393
STD 2	10.0	0.835
STD 3	12.5	1.062
STD 4	15.0	1.329
STD 5	20.0	1.835
STD 6	25.0	2.187
V-FLM (1:10)	¿?	0.976
V-ST (1:10)	¿?	1.069
V-Toc (1:10)	¿?	1.015

De acuerdo a la curva de calibración obtenida, la ecuación de la recta que la describe es:

$$y = 0.0920x - 0.0676$$

Con:

y = Absorbancia, A

x = Equivalentes de ácido gálico, [EAG] (mg L<sup>-1</sup>)

Por lo tanto, para el cálculo del contenido de antioxidantes totales en las muestras, expresado como equivalentes de ácido gálico (EAG), se procedió como se muestra a continuación para el vino Santo Tomás:

$$A^{745} = 0.0920[EAG]_3 - 0.0676$$

Despejando la concentración de EAG:

$$[EAG]_3 = \frac{A^{745} + 0.0676}{0.0920} = \frac{(1.069) + (0.0676)}{0.0920} = 12.35 \text{ mg L}^{-1}$$

Para la concentración en la dilución 1:10 simplemente se utiliza la ecuación para una dilución:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$[EAG]_2 = \frac{[EAG]_3 \times Vol_{dilución}}{Vol_{alícuota}} = \frac{(12.35 \text{ mg L}^{-1})(10.0 \text{ mL})}{0.5 \text{ mL}} = 247.09 \text{ mg L}^{-1}$$

Así mismo, para la concentración real en la muestra, se sigue el mismo procedimiento con los datos de la primera dilución:

$$[EAG]_1 = \frac{[EAG]_2 \times Vol_{dilución}}{Vol_{alícuota}} = \frac{(247.09 \text{ mg L}^{-1})(50.0 \text{ mL})}{5.0 \text{ mL}} = 2471 \text{ mg L}^{-1}$$

$$[EAG]_1 = \frac{2471 \text{ mg L}^{-1}}{PM_{AG}} = \frac{2471 \text{ mg L}^{-1}}{170.12 \text{ mg mmol}^{-1}} = 14.5 \text{ mmol L}^{-1}$$

Finalmente, los resultados de todas las muestras se muestran a continuación:

**Tabla 11.-** Contenido de polifenoles totales expresados como equivalentes de ácido gálico para las muestras obtenido por el método de Folin-Ciocalteu.

<b>Muestra</b>	<b>[EAG] (mmol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>[EAG] (mg L<sup>-1</sup>)</b>
V-Ar	18.063	3073
V-ArRe	13.860	2358
V-4S	14.049	2390
V-Em	15.065	2563
V-FLM	13.337	2269
V-ST	14.525	2471
V-Toc	13.831	2353

De acuerdo a los resultados obtenidos, el contenido de antioxidantes totales expresado como equivalentes de ácido gálico se encuentra en proporciones muy bajas y entre las muestras solo hay una variación de 1000 ppm que pudiera parecer poco a simple vista, pero son cantidades importantes en cuanto a la calidad y propiedades antioxidantes de cada muestra.

Así pues, hay que recalcar que el método de Folin-Ciocalteu no es un método específico para los antioxidantes de interés como lo son los compuestos polifenólicos, sino que el reactivo de Folin-Ciocalteu es un oxidante que puede reaccionar con cualquier otro reductor que tenga un potencial menor que el de dicho reactivo. Por lo tanto, los resultados obtenidos podrían estar tomando en cuenta especies como los azúcares reductores como lo demuestran Muñoz Bernal *et al* (2017) en su trabajo con otras matrices que igualmente contienen azúcares y compuestos polifenólicos. Lo anterior muestra que a futuro se debe profundizar en el tema y hacer un análisis con disoluciones de este tipo de azúcares para comprobar si la reacción con el reactivo de F-C se lleva a cabo o se modifica y en

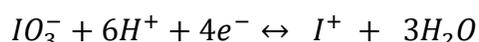
dado caso hacer las debidas correcciones por interferentes en los resultados finales. Además, otro aspecto a tomar en cuenta es la cinética de la reacción, ya que al ser muy lenta es difícil cerciorarse de que realmente esté reaccionando el 100% de los compuestos fenólicos.

## **6.6 Polifenoles totales por potenciometría**

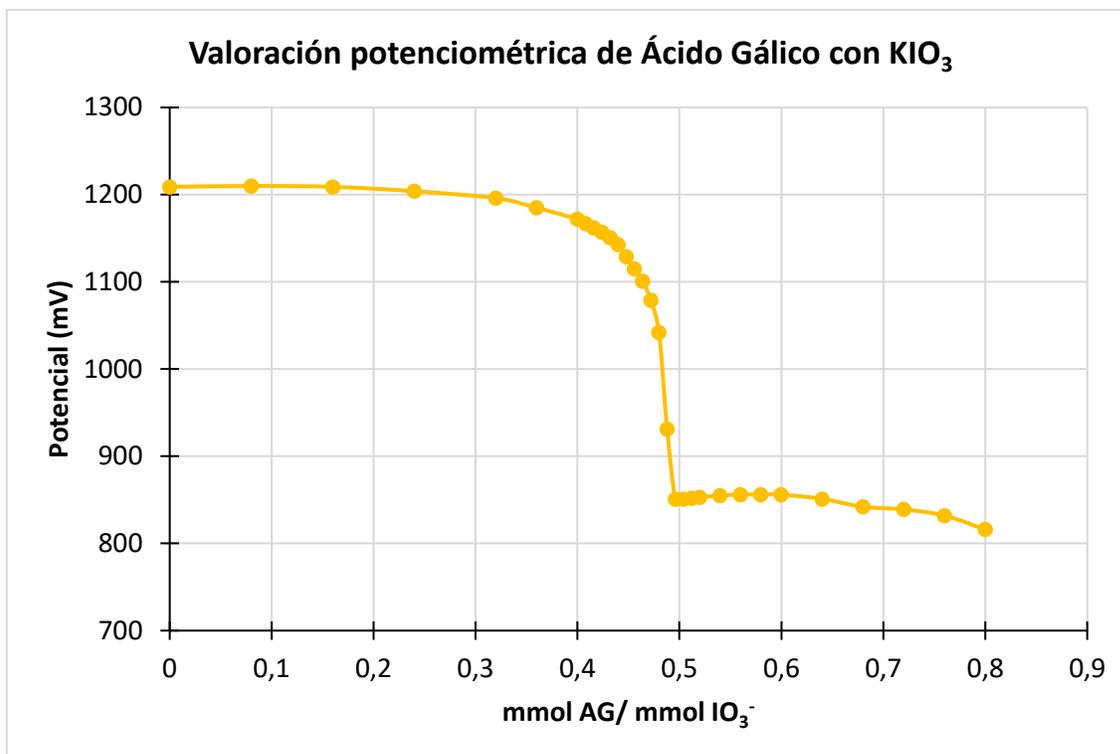
Esta fue la prueba desarrollada en el laboratorio para la determinación de antioxidantes totales por vía electroquímica. Para ello, esta determinación se conformó de 2 partes; el estudio electroquímico de la reacción del  $\text{IO}_3^-$  (oxidante) con el ácido gálico (reductor) y la medición de antioxidantes totales en las muestras.

### **6.6.1 Estudio electroquímico de la reducción del yodato con ácido gálico**

El  $\text{KIO}_3$  se utilizó como patrón primario y el ácido gálico como representante o equivalente de los polifenoles totales contenidos en las muestras de vino. En primera instancia se realizó un estudio analítico redox fundamental para definir las condiciones experimentales a utilizar, así como conocer la estequiometría entre estas especies en dichas condiciones. Se sabe que en condiciones suficientemente ácidas el  $\text{IO}_3^-$  se reduce a  $\text{I}^+$  de la siguiente manera:

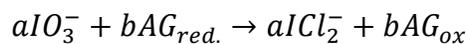


Sabiendo esto, se preparó una disolución de  $\text{KIO}_3$   $0.10001 \text{ mol L}^{-1}$  y una disolución de ácido gálico  $0.0200 \text{ mol L}^{-1}$ . Enseguida se valoró potenciométricamente la disolución recién preparada de ácido gálico con la disolución patrón de  $\text{KIO}_3$  en medio ácido. Esta determinación se realizó a distintas concentraciones iniciales de HCl utilizando un electrodo de platino, como electrodo de trabajo y un electrodo de Ag/AgCl, como electrodo de referencia. La concentración inicial de HCl a la que se decidió trabajar fue de  $7 \text{ mol L}^{-1}$ . La figura 18 muestra la valoración con la relación molar de las especies y su comportamiento.



**Figura 18.-** Curva experimental obtenida de la titulación potenciométrica de ácido gálico 0.02 mol L<sup>-1</sup> con 5.0 mL de yodato 0.10001 mol L<sup>-1</sup> en medio ácido.

Con los datos obtenidos de la experimentación se procedió a calcular los coeficientes estequiométricos de la siguiente reacción:



Los cálculos realizados, fueron los siguientes:

$$mmol \text{ de } IO_3^- = (Vol_{inicial} \text{ de } KIO_3)(Conc. \text{ de } KIO_3)$$

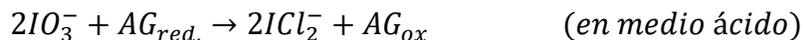
$$mmol \text{ de } IO_3^- = (5.0 \text{ mL}) \left( \frac{0.10001 \text{ mmol}}{\text{mL}} \right) = 0.50005 \text{ mmol}$$

Para la determinación de la cantidad de ácido gálico en el punto de equivalencia se utilizó el método gráfico en la curva de titulación potenciométrica, encontrándose un valor de 0.244 mmol.

Por lo tanto, para conocer los coeficientes estequiométricos de la reacción entre el yodato y el ácido gálico se calcula la relación molar de la siguiente forma:

$$\frac{a}{b} = \frac{\text{mmol de } IO_3^-}{\text{mmol de AG}}$$
$$\frac{a}{b} = \frac{0.50005 \text{ mmol de } IO_3^-}{0.244 \text{ mmol de AG}} = 2.049 \approx 2$$

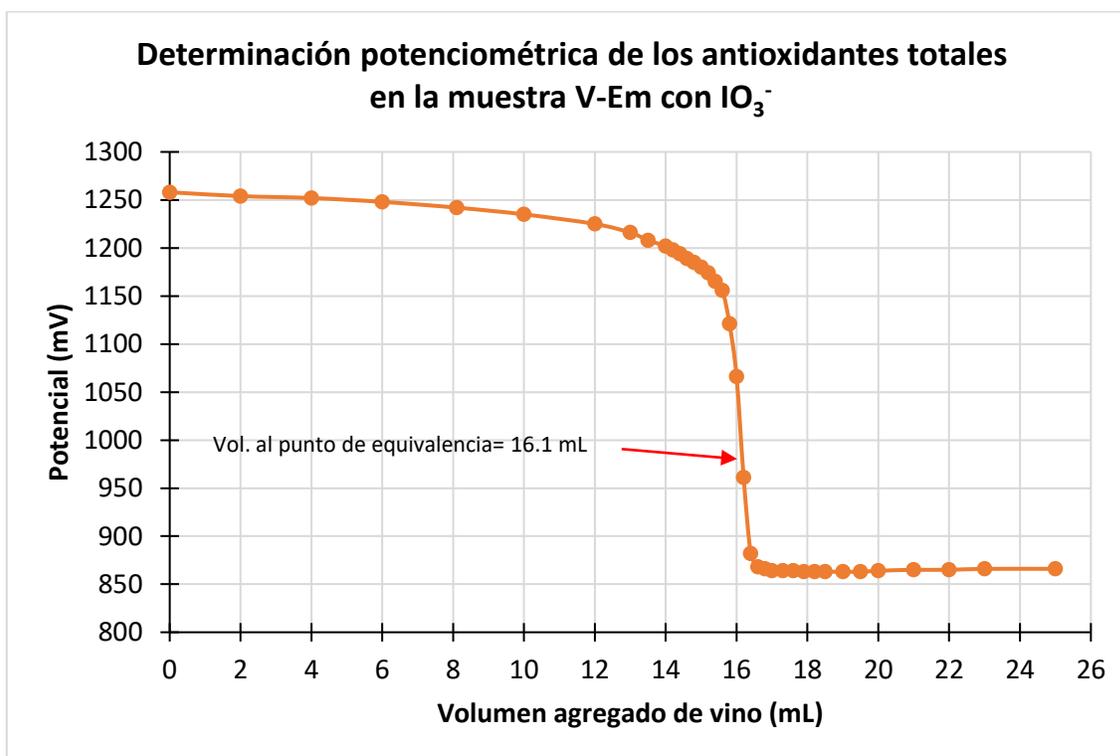
Así pues, se tiene que una molécula de ácido gálico se oxida con dos moléculas de yodato, es decir:



Según la semi reacción del  $IO_3^-$ , este se reduce a  $I^+$  con 4 electrones, por lo tanto, la oxidación del ácido gálico consume 8 electrones. También podemos observar que la curva de titulación muestra un comportamiento casi sigmoideal ya que en la zona después del punto de equivalencia el potencial se vuelve constante de manera súbita (figura 18), esto se puede adjudicar al hecho de que, pasado el punto final de la titulación, la disolución se comienza a enturbiar debido a la presencia de un sólido, el cual satura el electrodo de trabajo provocando así que el potencial sea constante.

### 6.6.2 Determinación de antioxidantes totales en muestras por potenciometría

Una vez definidas las condiciones experimentales se procedió a realizar la determinación en las muestras. Para ello, se utilizó la disolución de  $\text{KIO}_3$   $0.10001 \text{ mol L}^{-1}$  y la muestra se utilizó sin diluir, sólo se extrajo el volumen necesario de la botella y se filtró al vacío a través de un embudo de vidrio poroso para eliminar cualquier sustancia sólida; se endulzó y llenó una bureta de 25.0 mL con la muestra. Por otro lado, en un recipiente de vidrio, se agregaron 5.0 mL de la disolución de  $\text{IO}_3^-$  y en una probeta de 50 mL se agregaron 7 mL de agua desionizada con 18 mL de HCl concentrado, esta disolución se adicionó rápidamente a los 5.0 mL de  $\text{IO}_3^-$ , el sistema de electrodos se sumergió y la disolución se agitó con ayuda de una parrilla de agitación magnética. En seguida, se comenzó la titulación con la adición de la muestra lentamente, la figura 19 muestra a manera de ejemplo la titulación de una de las muestras.



**Figura 19.-** Titulación potenciométrica de la muestra Emiliana sin diluir con 5.0 mL de  $\text{KIO}_3$   $0.10001 \text{ mol L}^{-1}$  en medio ácido.

Para el cálculo de la concentración de los antioxidantes totales, expresados como equivalentes de ácido gálico, los cálculos son similares a los realizados en la sección de azúcares reductores; para el cálculo del potencial al punto de equivalencia, teniendo en cuenta la estequiometría de la reacción, se deduce la siguiente ecuación:

$$E_{eq} = E_{IO_3^-} - \frac{2\Delta E}{3} = E_{AG_{ox}} + \frac{\Delta E}{3}$$

Es decir, el potencial del punto de equivalencia para la reacción entre el  $IO_3^-$  y los antioxidantes totales se localiza a 2/3 partes del potencial condicional inicial del  $IO_3^-$  o a 1/3 parte de potencial condicional de los antioxidantes totales oxidados.

Para calcular el potencial al punto de equivalencia a partir de los datos experimentales se utiliza la ecuación deducida en la forma:

$$E_{eq} = E_{IO_3^-} - \frac{2\Delta E}{3}$$

En donde la diferencia de potenciales,  $\Delta E$ , está dada por el potencial impuesto inicialmente por el  $IO_3^-$  y por el potencial de la zona baja de la curva experimental el cual es impuesto por los antioxidantes oxidados. Así pues, siguiendo con el ejemplo del vino Emiliana, tenemos que:

$$E_{eq} = 1258 \text{ mV} - \frac{2(1258 - 864)\text{mV}}{3} = 995 \text{ mV}$$

Para calcular el factor que determina matemáticamente el incremento de volumen agregado (mL) por unidad de potencial (mV) para poder calcular el volumen al punto de equivalencia se toman, de los datos experimentales, dos valores de potencial;

antes y después del punto de equivalencia calculado con sus respectivos valores de volumen agregado:

$E_{p.e.}^*$ (mV)	$V_1$ (mL)	$E_1$ (mV)	$V_2$ (mL)	$E_2$ (mV)
997	16.0	1066	16.2	961

\*Potencial al punto de equivalencia

$$\text{Volumen de la muestra}_{p.e.} = V_1 + \left[ (E_1 - E_{p.e.}) \left| \frac{\Delta V}{\Delta E} \right| \right]$$

$$V \text{ de muestra}_{p.e.} = 15.5 \text{ mL} + \left[ (1097 - 997) \text{ mV} \times \left| \frac{(15.8 - 15.5) \text{ mL}}{(944 - 1097) \text{ mV}} \right| \right] = 16.1 \text{ mL}$$

Utilizando la concentración de la disolución patrón de  $\text{IO}_3^-$  y la estequiometría de la reacción, continuamos con los cálculos de la siguiente manera:

$$\text{mmol de } \text{IO}_3^- = (\text{Conc. de } \text{KIO}_3)(\text{Vol agregado})$$

$$\text{mmol de } \text{IO}_3^- = \left( \frac{0.10001 \text{ mmol}}{\text{mL}} \right) (5.0 \text{ mL}) = 0.50005 \text{ mmol}$$

$$\text{mmol } \text{EAG}_{pto.eq.} = \frac{1}{2} \text{ mmol } \text{IO}_3^-$$

$$\text{mmol } \text{EAG}_{pto.eq.} = \frac{0.50005 \text{ mmol}}{2} = 0.25003 \text{ mmol } \text{EAG}_{pto.eq.}$$

$$\text{Vol}_{pto.eq.} \text{ de la muestra} = 16.1 \text{ mL}$$

$$[\text{EAG}] = \frac{\text{mmol } \text{EAG}_{pto.eq.}}{\text{Vol}_{pto.eq.}} = \frac{0.25003 \text{ mmol}}{16.1 \text{ mL}} = 0.0155 \text{ mmol } \text{EAG } \text{mL}^{-1}$$

$$[\text{EAG}] = \left( \frac{0.0155 \text{ mmol } \text{EAG}}{\text{mL}} \right) \left( \frac{170.12 \text{ mg}}{\text{mmol}} \right) \left( \frac{1000 \text{ mL}}{\text{L}} \right) = 2636 \text{ mg } \text{EAG } \text{L}^{-1}$$

Así pues, se procedió de la misma manera para todas las muestras. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos de este análisis:

**Tabla 12.-** Contenido de polifenoles totales, expresado como equivalentes de ácido gálico, obtenido por potenciometría.

Muestra	mmol IO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	mmol <sub>pto eq</sub> EAG	Vol <sub>pto eq</sub> (mL)	(mmol EAG L <sup>-1</sup> )	(mg EAG L <sup>-1</sup> )
V-Ar	0.50005	0.25003	12.5	19.940	3392
V-ArRe	0.50005	0.25003	17.3	14.464	2461
V-4S	0.50005	0.25003	15.5	16.159	2749
V-Em	0.50005	0.25003	16.1	15.496	2636
V-FLM	0.50005	0.25003	18.6	13.414	2282
V-ST	0.50005	0.25003	17.8	14.062	2392
V-Toc	0.50005	0.25003	16.8	14.845	2525

Comprando los resultados obtenidos por el método de Folin-Ciocalteu y por el método potenciométrico, obtenemos la siguiente tabla:

**Tabla 13.-** Resultados del contenido de polifenoles totales en las muestras y expresado como equivalentes de ácido gálico obtenido por espectrofotometría y por potenciometría.

Muestra	Potenciometría		Folin-Ciocalteu	
	[mmol EAG L <sup>-1</sup> ]	[mg EAG L <sup>-1</sup> ]	[mmol EAG L <sup>-1</sup> ]	[mg EAG L <sup>-1</sup> ]
V-Ar	19.940	3392	18.063	3073
V-ArRe	14.464	2461	13.860	2358
V-4S	16.159	2749	14.049	2390
V-Em	15.496	2636	15.065	2563
V-FLM	13.414	2282	13.337	2269
V-ST	14.062	2392	14.525	2471
V-Toc	14.845	2525	13.831	2353

Como se puede observar, los resultados son similares, pero si ordenamos las muestras de mayor a menor contenido de antioxidantes totales, dicho orden difiere entre un método y otro. Por otro lado, el método de Folin-Ciocalteu arroja resultados muy cercanos, mientras que los resultados obtenidos por potenciometría se encuentran más alejados unos de otros.

Generalmente, el método de Folin-Ciocalteu se utiliza para cuantificar la cantidad de compuestos fenólicos en los vinos, pero en realidad lo que se mide es la capacidad antioxidante ya que el reactivo de F-C no es selectivo para ese tipo de compuestos como lo demuestran en su trabajo Muñoz Bernal *et al*, 2017. Y lo mismo ocurriría con el método potenciométrico propuesto; sin embargo, por potenciometría el trabajo experimental es más rápido, más sencillo y menos costoso. Además, las curvas de valoración potenciométricas obtenidas son mucho más nítidas y sin ambigüedades ya que se conoce con certeza la estequiometría de la reacción en comparación con lo que ocurre con el reactivo de F-C ya que, por su naturaleza, no se conocen de forma certera las especies que tienen lugar en la reacción.

## 7 CONCLUSIONES

- El método potenciométrico propuesto para la determinación de azúcares reductores residuales por medio del método de Fehling modificado es una gran alternativa al método clásico en donde se hace uso de las tablas de Fehling e indicadores visuales como el azul de metileno. El método propuesto es más rápido y preciso, ya que se conoce con certeza la estequiometría de la reacción y se utiliza una disolución de Cu (II) de concentración conocida, lo que nos permite prescindir tanto del uso de indicadores visuales, como de las tablas de Fehling.
- Con el método potenciométrico de la reacción de Fehling se puede descartar el uso de la clarificación de las muestras con carbón activado ya que debido al tiempo de contacto entre la muestra y el carbón activado este último puede adsorber parte de los azúcares de interés y producir un error por defecto.
- Para la determinación de sacarosa invertida, las muestras analizadas presentaron concentraciones mínimas que pueden adjudicarse a los distintos procesos antes, durante y después de la vinificación.
- El método potenciométrico propuesto de la reacción de Fehling es una excelente alternativa para el control de calidad respecto a los vinos que pueden haber sufrido una *chaptalización*, es decir, que el contenido de azúcar no proviene totalmente de la uva.
- Por los resultados obtenidos en la determinación de sacarosa en las muestras de vino, puede afirmarse que ninguna de las muestras analizadas fue sometida al proceso de chaptalización.
- La acidez titulable determinada por potenciometría permite conocer mejor el punto de equivalencia y con ello, la verdadera acidez del vino; este método no requiere ningún proceso adicional (clarificación ni indicador coloreado).
- El método fisicoquímico con el reactivo de Folin-Ciocalteu para la determinación de compuestos polifenólicos es demasiado tardado,

engorroso, además de que necesita tanto de reactivos y equipo de laboratorio de altos costos.

- Aunque el método potenciométrico propuesto para la determinación de polifenoles totales mostró ser mucho más rápido, eficiente y con menos residuos comparados con el método de Folin-Ciocateu aún falta trabajo por hacer debido a que los errores acumulados no permitieron obtener resultados con una precisión e incertidumbre adecuadas para la validación del método.
- Con los métodos propuestos en este trabajo se logra caracterizar y evaluar la calidad de muestras de vino tinto determinando 3 de los parámetros más importantes; azúcares residuales, acidez y antioxidantes totales. El trabajo presentado aquí es muy general e introductorio ya que hace falta hacer una validación de dichos métodos.
- Los métodos propuestos aquí son más rápidos, sencillos y de menor costo comparados con la mayoría de las técnicas que se utilizan actualmente. Por ello, los resultados aquí presentados permiten considerar estos métodos como adecuados para la parte cuantitativa en el control de calidad de la industria vinícola.

#### Perspectivas.

- La reacción de Fehling se considera específica para azúcares reductores; sin embargo, hay muchos aspectos que deben ser investigados o corroborados. Por ejemplo, comprobar que los polifenoles no intervienen en ella. También es de interés poder diferenciar los azúcares reductores presentes en los vinos.
- En la determinación de sacarosa es importante conocer más de la cinética de la hidrólisis y de la cantidad óptima de ácido fuerte necesaria.
- La determinación de antioxidantes con el  $\text{IO}_3^-$  ha dado buenos resultados, pero debe ser estudiada con más detalle para asegurar el grado de oxidación del yodo y optimizar las condiciones de determinación. Además, debe confirmarse que los azúcares reductores no intervienen en la determinación.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

- Adamski, J., Kochana , J., Nowak , P., & Parczewski , A. (2015). On the electrochemical biosensing of phenolic compounds in wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 46, 1-6.
- Alshabrawy , A., Mostafa , A., & Abotaleb, N. (2016). Utilization of oxidation-reduction reaction of Folin-Ciocalteu's phenol reagent in colorimetric determination of amlodipine in pharmaceutical dosage form. *European Journal of Chemistry*, 7(4), 387-390.
- AOAC. (1997). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. (16). Gaithersburg.
- Bakker, J., & Clarke, R. J. (2004). *Química del flavor del vino*. España: Acribia.
- Boulton, R. (1980). The relationships between total acidity, titratable acidity and pH in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 31(1), 76-80.
- Busto Olavarrieta, F. J. (2013). *Análisis químico y sensorial de vinos tintos*. Tesis de licenciatura, Universidad de La Rioja.
- Cañibano Alberola, M. (2012). *Efecto del perfil fenólico sobre las características antioxidantes de vinos tintos*. Trabajo fin de Master, Universidad de Valladolid, Valladolid.
- Cárdenas Rodríguez , N., & Pedraza Chaverri , J. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioidantes: aspectos básicos. *Educación Química*, 17(2), 164-173.
- Castañeda Ponce , L. M. (2013). *Determinación de azúcares reductores en mostos de agave y tequilas por FIA*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México , Ciudad de México .

- Cervantes Díaz, V. (2013). *Determinación de compuestos volátiles y polifenoles en vinos tintos*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cobos , D., Germano , L., Malovini, E., & Paladino , S. (2017). ¿Es posible determinar zúcares reductores en vinos por el método de Fehling Causse Bonnans, sin utilizar acetato neutro de plomo? *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 49(1), 197-204.
- Compound Interest. (28 de Mayo de 2014). *The key chemicals in red wine-color, flavor and potential health benefits*. Obtenido de <http://www.compoundchem.com/2014/05/28/redwinechemicals/>
- Darias Martín , J., Socas Hernández , A., Díaz Romero , C., & Díaz Díaz , E. (2003). Comparative study of methods for determination of titratable acidity in wine. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 555-562.
- Delanoe, D., Maillard, C., & Maisondieu, D. (2003). *El vino: del análisis a la elaboración* (5ta. ed.). Zaragoza, España: Acribia.
- Durand Guevara, L. V. (1993). *El vino: recopilación bibliográfica desde sus orígenes, hasta su servicio*. Tesis de licenciatura, Universidad La Salle, Ciudad de México.
- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green , A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., & Walker , R. B. (2010). A thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8139-8144.
- Fernández Escudero , J. A. (s.f.). *Química del vino*. Centro de Formación e Innovación Educativa, Departamento de Química Analítica, Valladolid, España.
- Ferreira, J., Goodman , B. A., Reichenauer, T. G., & Pirker, K. (2011). Is there a redox reaction between Cu(II) and gallic? *Free Radical Research*, 45(2), 123-132.

- Ferrer Gallego , R. (2011). *Estudio analítico y de la funcionalidad de la fracción fenólica de Vitis Vinifera L. cv. Graciano y su importancia en el color y la composición del vino* . Tesis doctoral, Universidad de Salamanca , Dpto. de Química Analítica, Nutrición y Bromatología , Salamanca.
- Galvez Navarro , S. A. (2007). *Determinación de taninos en vinos tintos de mayor consumo en El Salvador, procedentes de Chile y España*. Tesis de licenciatura, Universidad de El Salvador, San Salvador .
- García Martínez, E., Fernández Segovia , I., & Fuentes López , A. (s.f.). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*. Universitat Politècnica de València , Departamento de Tecnología de Alimentos .
- García Peña , Y. G. (2016). *Efecto del proceso de vinificación sobre la capacidad antioxidante, compuestos fenólicos y propiedades fisicoquímicas de vino blanco y tintos mexicanos*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México , Estado de México .
- Garriz , A. (2011). Divulgación: La Química del vino. Para celebrar el Año Internacional de la Química. *Educación Química* , 22(4), 282-287. Obtenido de <http://educacionquimica.info/include/downloadfile.php?pdf=pdf1259.pdf&download=1>
- Gerschman, R. (2012). *Guía Catadores del Vino Mexicano*. Ciudad de México, México: Planeta.
- Gillespie, H. (s.f.). *From grape to table: The chemistries of wine I*. Obtenido de Página web de la Universidad de Murcia: <https://www.um.es/docencia/barzana/DIVULGACION/QUIMICA/vino01.html>
- Huang, D., Boxin, O., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Jackson, R. S. (2008). *Wine Science. Principles and applications* (3ra ed.). Elsevier.

- Kilmartin, P. A. (2016). Electrochemistry applied to the analysis of wine: A mini-review. *Electrochemistry Communications*, 67, 39-42.
- Lozano García, T. P. (2010). *Revisión bibliográfica de los ensayos para evaluar la capacidad antioxidante mediante técnicas electroquímicas*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- Martínez López, J. D. (2016). *Determinación por métodos analíticos de la calidad de la miel de abejas nativas sin aguijón (Apidae: Meliponini) en la cuenca del Balsas, Michoacán México*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México , Departamento de Química Analítica, Ciudad de México.
- Matsuhiro, B., Torres, R., Zúñiga, E. A., Aguirre , M. J., Mendoza , L., & Isaacs, M. (2009). Determination of low molecular weight carbohydrates in cabernet sauvignon red wines. *Journal of Chilean Chemical Society*, 54(4), 405-407.
- Moreno, J., & Peinado, R. (2012). *Enological Chemistry*. España: Elsevier.
- Moreno-Arribas, M., & Polo, M. (Edits.). (2009). *Wine Chemistry and Biochemistry* . Springer.
- Muñoz Bernal , Ó. A., Torres Aguirre, G. A., Núñez Gastélum , J. A., de la Rosa , L. A., García, J. R., Ayala Zavala , J. F., & Álvarez Padilla , E. (2017). Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 20(2), 23-28.
- Muñoz Ramos, J., & Ávila Granados, J. (2001). *Todos los vinos del mundo (7a ed.)*. Barcelona, España: Planeta.
- Nieto Godínez, Y. (2010). *Manual del vino mexicano: su historia, características y proceso tecnológico*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México , Estado de México.

- Noriega Rendón, K. E. (2016). *Anteproyecto de microindustria productora de vino artesanal en la Ciudad de México*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- Norma mexicana, NMX-V-006-1983. (1983). *Bebidas alcohólicas. Azúcares Reductores Directos y Totales. Método de Prueba*. Obtenido de Dirección General de Normas.
- Norma mexicana, NMX-V-012-1986. (1986). *Bebidas alcohólicas. Vinos. Especificaciones*. Obtenido de Dirección General de Normas.
- OIV. (2000). *Método de medida del potencial de oxidorreducción en los vinos*. Obtenido de <http://www.oiv.int/public/medias/2947/oeno-3-2000es.pdf>
- OIV. (2009). *Compendium of International Methods of Analysis - OIV Fixed Acidity*. Obtenido de <http://www.oiv.int/public/medias/2500/oiv-ma-as313-03.pdf>
- OIV. (2009). *Compendium of International Methods of Analysis - OIV Folin-Ciocalteu Index*. Obtenido de <http://www.oiv.org/public/medias/2477/oiv-ma-as2-10.pdf>
- OIV. (2009). *Compendium of International Methods of Analysis - OIV Reducing substances*. Obtenido de <http://www.oiv.org/public/medias/2481/oiv-ma-as311-01a.pdf>
- OIV. (2015). *Compendium of International Methods of Analysis - OIV Volatile Acidity*. Obtenido de <http://www.oiv.int/public/medias/3732/oiv-ma-as313-02.pdf>
- OIV. (2015). *Compendium of International Methods of Analysis - OIV Total Acidity*. Obtenido de <http://www.oiv.int/public/medias/3727/oiv-ma-as313-01.pdf>
- OIV. (2018). *Definición de los productos de la vid*. Obtenido de <http://www.oiv.int/public/medias/5985/definicion-de-productos.pdf>
- OIV. (2020). *Actualidad de la coyuntura del sector vitivinícola mundial en 2019*. Obtenido de <http://www.oiv.int/js/lib/pdfjs/web/viewer.html?file=/public/medias/7304/es-actualidad-de-la-coyuntura-del-sector-vitivinicola-mundia.pdf>

- OIV. (2021). *International Standar for the Labelling of Wines*. Obtenido de <http://www.oiv.int/public/medias/7719/en-oiv-international-standard-for-the-labelling-of-wines-202.pdf>
- Pigani, L., Rioli, C., Foca , G., Ulrici, A., Seeber , R., Terzi , F., & Zanardi , C. (2016). Determination of polyphenol content and colour index in wines through PEDOT-modified electrodes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(26), 7329-7338.
- Porgali, E., & Büyüktuncel , E. (2012). Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high perfrmance liquid chromatography and spectrophotometric methods. *Food Research International*, 45, 145-154.
- Preza, J. (2007). *Estudio electroquímico aplicado a la cuantificación de azúcares en mieles*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Química Analítica, Ciudad de México .
- Rebelo, M. J., Rego , R., Ferreira, M., & Oliveira, M. C. (2013). Comparative study of the antioxidant capacity and polyphenol content of Douro wines by chemical and electrochemical methods. *Food Chemistry*, 141, 566-573.
- Reynoso Ron, J. (1996). *Viticultura, enología y algo más*. México : McGraw Hill/Interamericana de México .
- Ribéreau-Gayon , P., Dubourdieu, D., Donèche , B., & Lonvaud , A. (2006). *Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications* (2da ed.). Francia: John Wiley & Sons, Ltd.
- Šeruga, M., Novak , I., & Jakobek , L. (2011). Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, 124, 1208-1216.
- Singleton, V. L., Orthofer , R., & Lamuela-Raventós , R. M. (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.

- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F., & Crouch, S. R. (2000). *Química Analítica* (7a ed.). México: McGraw Hill Interamericana.
- Slinkard , K., & Singleton , V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.
- Thermo Fisher Scientific. (s.f.). *Titrateable Acidity of Red Wine by Manual Titration (Potenciometric)*. Obtenido de <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/AN-TITRACID-E-1114-RevA-WEB.pdf>
- Vogel , A. I. (1962). *A text-book of quantitative inorganic analysis including elementary instrumental analysis* (3ra ed.). London: Longmans.
- Volmer , D. A., Curbani , L., Parker , T. A., Garcia, J., Schultz , L. D., & Borges , E. M. (2017). Determination of Titrateable Acidity in Wine Using Potentiometric, Conductimetric , and Photometric Methods. *Journal of Chemical Education*, 94(9), 1296-1302.
- Wesson, J. (2008). *Vino y Comida. Una nueva mirada al sabor*. Grijalbo.
- Wong, G., & Caputi , A. (1966). A New Indicator for Total Acid Determination in Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 17(3), 174-177.