

76
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**DETERMINACION DE ANTOCIANINAS EN VINO
TINTO POR METODOS CROMATOGRAFICOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A :

LUZ MARIA VERONICA GARCIA MANZANO



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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	Prof. Ernestina Cervera Flores
Vocal	Prof. Adolfo García Osuna
Secretario	Prof. Araceli Peña Álvarez
1er suplente	Prof. Santiago Capella Vizcaino
2o. suplente	Prof. Victoria Coutiño Covarrubias

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Cromatografía de Gases, Departamento de
Química Analítica, DEPg, Facultad de Química, UNAM.

Asesor del tema:

Dra. Araceli Peña Álvarez

Supervisor técnico:

M. en C. Santiago Capella Vizcaino

Sustentante:

Luz María Verónica García Manzano

Araceli Peña Álvarez
[Signature]
[Signature]

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	2
1.1 Descripción	2
1.2 Propiedades	4
1.3 Distribución e Importancia	6
1.4 Presencia de Antocianinas en Vino Tinto	7
1.4.1 Definición de Vino	7
1.4.2 Caracterización de Antocianinas	7
1.4.3 Modificación de Antocianinas en Vino Tinto	9
1.4.4 Distribución de las Antocianinas en diferentes Especies de <i>Vitis</i>	11
1.5 Métodos de Análisis	13
1.5.1 Determinación del color en Vinos	14
1.5.2 Electroforesis	15
1.5.3 Cromatografía	15
1.5.3.1 Cromatografía en Papel y en Capa Fina	16
1.5.3.2 Cromatografía en Columna Abierta	17
1.5.3.3 Cromatografía de Gases	17
1.5.3.4 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia	18
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	20
2.1 Reactivos	21
2.2 Estándares	21
2.3 Muestras	22
2.4 Metodología	
2.4.1 Purificación de Antocianinas	22
2.4.2 Obtención del Extracto de Uva no Comercial	23
2.4.3 Cromatografía de Gases Capilar a Alta Temperatura	24

2.4.4 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia en Fase Inversa	25
2.4.5 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia en Fase Inversa por Pares de Iones	25
2.4.5.1 Análisis Espectrofotométrico	26
2.4.5.2 Determinación de Colorantes Artificiales	26
3. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS	27
3.1 Purificación de Antocianinas	27
3.2 Cromatografía de Gases Capilar a Alta Temperatura	29
3.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia	35
3.3.1 Determinación del Color en Vinos Tintos	49
3.3.2 Prueba de Arata	54
4. CONCLUSIONES	55
5. ANEXOS	57
6. BIBLIOGRAFIA	62

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres:

Este es uno de los frutos de aquella semilla que hace tiempo juntos sembraron, cuidaron y fortalecieron con enseñanzas cada día.

A mis Hermanos:

Que con ellos aprendí el valor de la unidad y he tomado ejemplo de lucha y perseverancia.

A mis Amigos:

... que así como una flor silvestre me dicen la verdad desnuda, también como el viejo sauce predicar la sabiduría ...

Donde quiera que te encuentres, Gracias Eitel.

... una auténtica concepción de la relación entre dos seres no samite vencedores ni vencidos. Solo sabe hacer algo grandioso: entregarse sin límites para descubrir una identidad propia, más rica, profunda y mejor ...

dedicada especialmente a Haroldo

Gracias al maestro Santiago Capella por abrirme las puertas de un lugar mágico. donde encontré amigos y aprendí mucho de ellos.

Gracias a Spectrum y a la casa Pedro Domecq por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

Gracias al departamento de Química de Alimentos, a la maestra Lucía Cornejo, Lili Gómez y Victoria Coutiño, de quienes siempre recibí apoyo.

Y finalmente gracias a Fundación UNAM por la beca otorgada

Introducción

La historia del vino es tan antigua que no se ha establecido con precisión el origen de esta práctica ya que existen evidencias arqueológicas de más de siete mil años de antigüedad (1) su mención como bebida data desde las épocas más antiguas, gozando de nobleza y popularidad a través de los tiempos. La industria vinícola mexicana a pesar de ser la más antigua del continente americano, reinicia su desarrollo formal hasta fines del siglo pasado (2) y aunque en las últimas décadas ha mejorado notablemente (3,4) aún falta camino por recorrer en este esfuerzo de prosperar.

La uva tinta debe su color a la presencia de antocianinas, que son los pigmentos naturales responsables de las tonalidades rojo, violeta y azul ampliamente distribuidos en frutos y pétalos de flores. La uva puede clasificarse dependiendo del uso para el que es destinado: uva de mesa, uva pasa, uva para destilados, uva para jugo y uva para la elaboración del vino. Sin embargo, el único género permitido para vinificación es el *Vitis vinifera* (5,6) pudiendo verificar su autenticidad por el análisis de antocianinas en vino tinto (5) ya que se tiene una composición específica, por lo que dicha determinación puede servir como parámetro de control en el mercado vitivinícola.

En México no existe reglamentación al respecto por lo que en este proyecto se pretende desarrollar una metodología analítica que permita el análisis de antocianinas en vino tinto, como un primer acercamiento al establecimiento de dicha regulación.

Para lograr este objetivo, se planteó el trabajo experimental de la siguiente manera. Primero, purificación de antocianinas por Extracción en Fase Sólida con el fin de obtener estándares. Segundo, obtención de un perfil cromatográfico de antocianinas utilizando cromatografía de gases capilar y/o cromatografía de líquidos de alta eficiencia y Tercero, aplicación de la metodología desarrollada en vinos tintos.

El estudio se complementó con la determinación espectrofotométrica de antocianinas en vino tinto con el fin de relacionar su concentración con la edad del mismo que puede también hablar de las condiciones de almacenamiento de cada muestra. Además se practicó la prueba de Arata (que sirve para detectar la adición de colorante artificial) a algunas muestras que presentaron un perfil cromatográfico fuera del esperado.

1. Antecedentes

1.1 Descripción

Las antocianinas, del griego Anthos: flor y Kyanos: azul, es la terminología usada originalmente para describir al pigmento azul de la flor del maíz (7). Corresponden a la clase más extendida de compuestos fenólicos llamados colectivamente flavonoides.

Una de las funciones más importantes de las antocianinas en el área de percepción visible es la atracción de animales (principalmente insectos y aves) con propósitos de polinización y dispersión de semillas por lo tanto tienen un valor considerable en la co-evolución de las interacciones planta-animal (8).

Los flavonoides tienen efectos importantes en la fisiología y bioquímica de las plantas, actuando como antioxidantes y en la inhibición de enzimas. Se ha reconocido extensamente su actividad antiviral, antialérgica, antiinflamatoria, y anticancerígena (9).

Hasta ahora no se ha reportado un proceso biotecnológico exitoso usando cultivos celulares de plantas para la producción de las antocianinas desecadas. De cualquier forma, el uso de las antocianinas no se ha extendido a la industria alimentaria debido a su inestabilidad por factores físicos y químicos (luz, pH y oxígeno) y a su dificultad de purificación que se traduce en muy escasa disponibilidad comercial (7).

La estructura química de las antocianinas (Figura 1, Tabla 1) es el derivado glucosilado polihidroxiado del 2-fenil benzopirano (11) unido al carbohidrato por medio de un enlace β -glucosídico. Las antocianidinas a las cuales se les llama también agluconas son las antocianinas sin glucósidos (10). Los diferentes colores de las antocianinas son debidos a la sustitución en cada molécula de antocianina, es decir a los grupos hidroxilo, metilo y glucósido. La glucosilación puede ocurrir en las posiciones 3, 5 y 7 (Figura 1) (12).

Generalmente se encuentran cinco antocianinas en uvas tintas: malvidin-, delphinidin-, peonidin-, cianidin- y petunidin-3-d-glucósido. El azúcar comúnmente en estos flavonoides es la glucosa (11). Aunque se han encontrado D-glucosa, D-galactosa, D-arabinosa y D-xilosa.

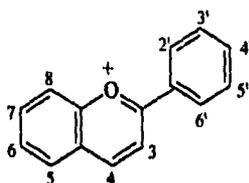


Figura 1. Estructura general de antocianinas

Tabla 1. Sustituyentes de las antocianinas comunes en uva.

Antocianidinas	Posición de la Sustitución						
	3	5	6	7	3'	4'	5'
Delphinidin	O-glucósido	OH	H	OH	OH	OH	OH
Cianidin	O-glucósido	OH	H	OH	OH	OH	H
Petunidin	O-glucósido	OH	H	OH	OMe	OH	OH
Peonidin	O-glucósido	OH	H	OH	OMe	OH	H
Malvidin	O-glucósido	OH	H	OH	OMe	OH	OMe

Además de pétalos y frutos las antocianinas pueden estar en otros órganos de la planta como raíces y hojas, así como acumuladas en las vacuolas o células epidérmicas (11).

Las antocianinas se encuentran generalmente en solución dentro de las vacuolas, aunque algunas veces se pueden localizar en vesículas esféricas llamadas "antocianoplastos", en donde pueden ocurrir modificaciones en la estructura básica de las antocianinas. Los antocianoplastos se detectan usualmente en las vacuolas, aunque pueden aparecer también como vesículas membranosas en el citoplasma. La presencia o ausencia de antocianoplastos puede dar información adicional en los estudios taxonómicos (11).

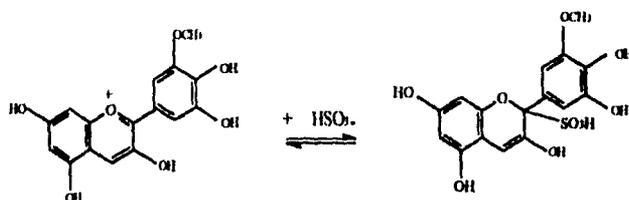


Figura 3. Reacción de las antocianinas con los iones bisulfito

Las antocianinas son también decoloradas por reducción, y la reacción de nuevo es reversible (Figura 4). El mecanismo de esta reacción no se ha explicado, pero se supone que ocurre por medio de la estructura de la flavona. Esta reacción explica el brillo de algunos vinos frescos de los tanques de fermentación que tienen un proceso fuertemente reductor (5).

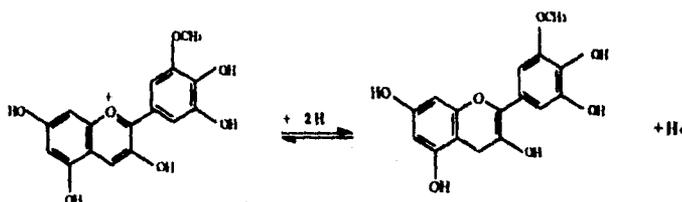


Figura 4. Reacción de reducción de las antocianinas

Las antocianinas con dos OH en posición orto en el anillo aromático forman un complejo con los metales pesados (hierro y aluminio) que da como resultado un complejo insoluble de color azul. La adición de hierro a vinos tintos ricos en antocianinas, aumenta su color produciendo brillantez (5).

Además del catión flaviilium, considerada la estructura primaria, las antocianinas se encuentran en solución ácida en su estructura secundaria, que es una mezcla de la base quinoidal, la pseudobase carbinol y la pseudobase chalcona (anexo 2). En adición, los mecanismos posibles de estabilización conducen a la estructura terciaria, asociándose entre ellas mismas, (copigmentación) y la formación de

complejos con metales. La copigmentación es probablemente el mecanismo más eficiente de protección, evitando el ataque nucleofílico de las estructuras quinoidales presentes en agua en medios ligeramente ácidos de muchas vacuolas (11).

1.3 Distribución e importancia

Las antocianinas son el grupo más importante de pigmentos vegetales solubles en agua visibles al ojo humano. Con pocas excepciones, como las betalainas, son los colorantes universales de plantas y responsables del color ciano de pétalos de flores y frutas (11).

Los colores rojos probablemente más extendidos en alimentos son debidos a las antocianinas, por ejemplo en jugos de frutas, vinos, licores y mermeladas ya que las antocianinas han sido identificadas en plantas comestibles de tipo diverso como manzana, col morada, cereza, uva, fresa, arándalo y rábano entre otros (7).

En uva tinta los pigmentos se encuentran concentrados en el hollejo y pueden o no estar presentes en la pulpa. La composición media de la uva se muestra en el anexo 2.

De los datos publicados, se obtienen diferentes perfiles cromatográficos cuando se trabaja con fresas, cerezas, uvas, etc., por lo que el interés en examinar el problema de pureza de los productos alimenticios preparados de frutas rojas se puede resolver con estos perfiles o para ayudar a la determinación de adulteraciones en productos de esta naturaleza (13). Por lo que la importancia de la determinación de antocianinas puede tener efectos no sólo en el análisis del vino, sino también en la regulación de transacciones comerciales.

1.4 Presencia de Antocianinas en Vino Tinto

1.4.1 Definición de Vino

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-V-12-1986) se define al vino como "bebida resultante, exclusivamente, de la fermentación alcohólica completa o parcial de mostos de uva en contacto o no de sus orujos" y vino tinto "el producto de la vinificación de los mostos de uvas tintas, con maceración más o menos prolongada de sus orujos, o de la vinificación de mostos de uvas cuyo jugo es tinto" (14).

Para obtener un vino de buena calidad ha de cuidarse su elaboración desde el principio y aunque todas las fases son importantes, no se hace buen vino de materia prima deficiente. Es fundamental para obtener un buen vino, proceder de un viñedo elegido y la variedad de uva pone el sello definitivo en el vino producido en cuanto a calidad del mismo y en cuanto a la posibilidad de desarrollo durante su conservación en madera y en botelle (15).

1.4.2 Caracterización de Antocianinas

Para la producción de vino de calidad simple o con título, sólo pueden utilizarse variedades recomendadas o autorizadas, pertenecientes a la especie *Vitis vinifera* (5, 6, 16, 20). Los vinos tienen una calidad desigual en razón de su procedencia, de las cepas a partir de las cuales han sido elaborados, y de las prácticas culturales y tecnológicas que intervienen, por lo que el origen es así determinante de la calidad del vino, y de su valor (17).

Uno de los problemas en la producción de vinos es su correcta caracterización e identificación, pues aunque se han empleado expertos en análisis sensorial como cuerpos reguladores esto no es garantía de un resultado correcto. En consecuencia, es muy clara la necesidad de establecer métodos de análisis confiables para la identificación y caracterización de vinos en la base de

parámetros fisicoquímicos reproducibles con el propósito de establecer procedimientos de control de calidad estandarizados (18).

La identificación de antocianinas con diglucósidos prueba el linaje híbrido de la uva del vino, pero su ausencia no es prueba que la uva o el vino es de *Vitis vinifera* (19). Los monoglucósidos están presentes en todas las especies del género *Vitis*, los diglucósidos están en cambio, característicamente ausentes en la *V. vinifera*. Mientras los diglucósidos aparecen en decenas o centenas de miligramos en las uvas diferentes de la *vinifera*, en los vinos derivados de estas últimas se admiten diglucósidos hasta 2 mg/l o poco más. En Europa la identificación de la presencia de malvidin diglucósido a niveles de 5 mg/l o más, se considera una prueba de adulteración del vino de *V. vinifera* con otras especies de *Vitis*, ya que se ha comprobado que con sólo el 3% de vino híbrido se suele pasar de los 5 mg/l (20).

He aquí una clave analítica para diferenciar los vinos tintos obtenidos de variedades de *vinifera* de los vinos tintos obtenidos de híbridos productores directos. Además también para identificar eventuales mezclas de vinos de diferentes procedencias (21).

Los pigmentos de la uva o antocianinas están presentes únicamente en la uva tinta y las cantidades cambian dependiendo de la variedad. El intervalo reportado es de 0.042 - 5.933 g de pigmentos monoglucósido por kilogramo de fruta. Para vinos jóvenes el contenido es de 200-500 mg/l (20).

Muchas uvas tintas tienen contenidos en antocianinas del orden de los 800 mg/l (Cabernet franc, Pinot noir), mientras los contenidos mínimos se acercan a los 100 mg/l (Grenache) o 400 mg/l (Gamay) y los máximos que se producen en variedades de *Vitis vinifera* están sobre los 2,000 mg/l (Syrah), alrededor de 5,000 mg/l (Alicante Bouschet), o hasta los 10,000 mg/l en cualquier híbrido (21). Singleton reporta una concentración arriba de 500 mg/l y en vinos tintos viejos, aproximadamente 10 mg/l (22).

El contenido de antocianinas en uva es normalmente mayor que el reportado para vinos, debido a que sufren modificaciones con los diferentes procesos de vinificación, en la maduración y almacenamiento.

1.4.3 Modificación de Antocianinas en Vino Tinto

El cambio de color en el vino tinto, que pasa de la tonalidad rojo-violeta a rojo ladrillo es debido a las transformaciones de los polifenoles (15).

El grado de extracción de colorantes de la uva depende de la variedad, de la región de cultivo, del clima en el que se cosecha, el grado de madurez, y las condiciones físicas de la fruta. En la viticultura interviene el prensado, grado de desgarramiento, temperatura de fermentación, manejo del sombrero, niveles de SO_2 , oxígeno y alcohol (22).

El vino recién fermentado es un sistema complejo que sufre cambios posteriores durante la maduración y el almacenamiento. Los parámetros sensoriales alterados durante este periodo incluyen al color, que tiende a perder viveza. Los compuestos fenólicos son los principales agentes responsables del cambio de color en los vinos tintos; estos compuestos tienen diferentes reacciones de oxidación, condensación y polimerización resultando usualmente en cambio del tono violeta al anaranjado (23).

Después de terminar las fermentaciones, alcohólica y maloláctica (si es que se verifica esta última), es conveniente estabilizar al vino con procedimientos que no lo alteren ni pierdan las cualidades de su elaboración.

Algunos vinos tintos reciben un tratamiento adicional para su mejora, por medio del procedimiento conocido como crianza, con el fin de adquirir mejores cualidades sensoriales, en vistas de obtener un vino más afinado.

La crianza tradicional de vinos tiene dos etapas: la etapa vino-madera, llamada también fase oxidante, y la etapa vino-vidrio, llamada de reducción o fase reductora (24).

Durante el añejamiento del vino tinto se produce toda una serie de modificaciones, como son: Modificaciones de orden químico: oxidación de polifenoles, formación de aldehídos, acetales, ésteres, hidrólisis de los polisacáridos. Modificaciones de orden físico: insolubilización de sales, desarrollo de gas, evaporación de sustancias volátiles, solubilización de sustancias extractivas de la madera. Modificaciones de orden biológico: fermentaciones lácticas, formación de ácido acético, autólisis de las células de los microorganismos, tal vez alteración por acción de las bacterias. Modificaciones de orden físico-químico: fenómenos de oxido-reducción, formación y floculación de coloides. Además de las sustancias que se forman, hay otras que desaparecen, como los aromas afrutados o herbáceos de vinos jóvenes, que son sustituidos por perfumes terciarios (los secundarios son los que se forman durante la fermentación alcohólica).

La disminución de las antocianinas depende de la condensación de sus moléculas, las cuales pasan progresivamente al estado coloidal que precipitan y se depositan en el fondo. Tal disminución es aproximadamente del 30-35% después de 3 meses, 50% después de un año, 65% después de dos años, 75% después de 3 años, 85% después de 4 años. El fenómeno va precedido por la hidrólisis que transforma a las antocianinas en las agluconas correspondientes, las cuales después fácilmente se oxidan, se polimerizan y se condensan hasta la formación de gruesas micelas coloidales que precipitan. De aquí el ligerísimo aumento de azúcares que se produce en los vinos envejecidos.

En términos generales, se puede decir que un vino tinto es más añejable cuanto más alto es su contenido de antocianinas: si contiene inicialmente pocas antocianinas poco polimerizadas, envejece rápidamente y no es conservable largo tiempo, y a la inversa. Se ha visto que el contenido de antocianinas disminuye con el tiempo y otros componentes tienden a sustituirlos variando el tono a amarillo (21).

1.4.4 Distribución de las Antocianinas en las Diferentes Especies de *Vitis*

La distribución de antocianinas en uvas es muy complejo, varía en el género *Vitis* como una función de las especies, que pueden contener desde 6 hasta 17 miembros de esta familia de pigmentos (5).

Esta distribución dentro del género *Vitis* y en especial dentro del *Vitis vinifera* conforma lo que llamaremos perfil cromatográfico, que implica conocer cuales antocianinas están presentes, su proporción relativa y el orden de elución de acuerdo a la polaridad de cada molécula, como a continuación se describe.

Las antocianinas de uva tinta *Vitis vinifera* están basadas en la predominancia de malvidina (5, 19, 22, 25, 26). Malvidin 3-monoglucósido es el que se encuentra en mayor proporción (33-60%), le siguen malvidin 3-p-cumaril glucósido, malvidin 3-acetil glucósido y malvidin 3-cafeoil glucósido.

En la Tabla 2 se muestran los resultados del estudio realizado por Ribéreau-Gayón (5) donde las antocianinas encontradas en las variedades de *Vitis vinifera* son 5, su abundancia en orden ascendente es cianidina, peonidina, petunidina, delphinidina y malvidina lo que es confirmado con otros estudios sobre el tema (22). Los sustituyentes de las antocianinas pueden ser glucósidos en posición 3, acil-monoglucósidos en posición 3, diglucósidos en las posiciones 3 y 5 y acil 3,5-diglucósidos. Aunque tratándose de *V. vinifera* únicamente se han encontrado monoglucósidos y acil-monoglucósidos en posición 3, en este último grupo generalmente los derivados de malvidina son los de mayor proporción y fácil distinción.

Las siguientes aseveraciones (extraídas del análisis de la Tabla 2) son importantes para la interpretación de los resultados cromatográficos esperados:

1. Malvidina 3-monoglucósido es el principal constituyente de la materia colorida de la uva en *V. vinifera*.
2. No se han encontrado antocianidinas en la materia colorida de uvas.
3. Los diglucósidos de las antocianinas ocurren frecuentemente en especies americanas pero no en las de *V. vinifera*. Esta afirmación es muy importante

porque hace posible la diferenciación entre uvas y vinos de *V. vinifera* y de híbridos.

4. La presencia de derivados de cianidina y peonidina en uvas es común, aunque son abundantes sólo en algunas especies.

5. Por último, la ausencia de antocianinas aciladas es demostrada para las variedades Pinot y esta característica es específica para éstas variedades de *V. vinifera* (5).

Tabla 2. Distribución de la cantidad de antocianinas en las diferentes especies del género *Vitis*.

Antocianinas	Especies de <i>Vitis</i>													
	<i>rotundifolia</i>	<i>riparia</i> *	<i>rupesstris</i> *	<i>labrusca</i> *	<i>arizonica</i> *	<i>berlandieri</i> *	<i>monticola</i> *	<i>cordifolia</i> *	<i>rubra</i> *	<i>lincecumae</i> *	<i>aestivalis</i> *	<i>amurensis</i>	<i>vinifera</i> (a) (b)	
Total	6	15	12	11	11	10	6	11	12	17	9	7	5	9
Delphinidin														
a		14	9	21	13	23	36	15	30	17	31		6	12
b		1	3							6				
c	38	12	34						1	1				
d		2	6							3				
Cianidin														
a		2		5	8	8	3	10	20	29	31		20	3
b										7				
c	9	5	2		1				1	2	3			
d										5				
Petunidin														
a		10	3	15	10	20	26	18	20	8	10	5	9	12
b		1												
c	29	17	22	1	1	1		2	2	1				
d		3	2							3				
Peonidin														
a				10	14	16	5	11	5	7	11	13	45	15
b				3	1	1			1					2
c	6	2	8	1	10	2		2	1	3	4	15		
d										2				
Malvidin														
a		6	2	34	29	25	27	30	16	4	6	27	20	36
b		2		7	3	2	3	4			2			9
c	18	21	8	2	10	2		5	2	1	2	40		
d		2	1					2		1				

Las especies señaladas con asterisco son especies americanas.

a=monoglucósido; b=acil monoglucósido; c=diglucoído; d=acil diglucoído

(a) = Muscat Hambourg; (b) = otras variedades estudiadas de *V. vinifera*.

Los datos son porcentaje de la cantidad total de cada pigmento.

El orden de elución para las antocianinas de uva en cromatografía de líquidos de fase inversa es, de acuerdo a la polaridad de cada molécula delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina (18, 25-33). Adicionando un segundo carbohidrato a la aglicona, la molécula es más polar por lo que su retención disminuye y el grupo de antocianinas diglucósido eluye antes de las antocianinas monoglucósido.

Con la presencia de un grupo acetil (u otro ácido enlazado al monosacárido) la retención de la molécula aumenta, emergiendo de la columna después que las antocianinas monoglucósido. El orden de elución se mantiene utilizando pares de iones (61).

Las antocianinas de *Vitis vinifera* se encuentran no sólo como 3-glucósido, también se encuentran los ésteres con ácido acético (3-acetil glucósido), y ácido p-cumárico (3- p cumaril glucósido) y en ocasiones como 3-cafeoil glucósido, como en el caso de Cabernet Sauvignon (27).

1.5 Métodos de Análisis

A continuación se presenta una breve revisión de las técnicas reportadas en la literatura más utilizadas para el análisis de antocianinas.

Generalmente se parte de la extracción de antocianinas del material a estudiar y considerando que las antocianinas son muy solubles en agua, pueden extraerse fácilmente con disolventes polares. La extracción es comúnmente acompañada de maceración y machacado del material vegetal en soluciones alcohólicas acidificadas, después de lo cual puede llevarse a cabo la purificación de los pigmentos.

Existe amplia bibliografía sobre la alta labilidad de las antocianinas aciladas, lo que hace necesario llevar a cabo la extracción de pigmentos con metanol o etanol conteniendo ácidos débiles como acético (34-39), tartárico o cítrico, en lugar de HCl, que puede conducir a la degradación de antocianinas por la concentración de éste (7) sin embargo, es el ácido más utilizado (40-43).

Para la purificación del extracto crudo de antocianinas se han empleado numerosas técnicas con resultados exitosos. Estas incluyen la extracción con polivinilpirrolidona (PVP) (41), Sephadex LH 20 (34-36, 39, 40, 43, 44), poliamida (43), resinas intercambiadoras como Amberlita CG-50 (37, 44-49) y Amberlita XAD-7 (40), Extracción líquido-líquido (42) y Extracción en Fase Sólida (EFS) con cartuchos C-18 (49).

La EFS se utilizó para la purificación de antocianinas en esta investigación debido a su fácil manipulación. Para seleccionar el material de soporte fue necesario considerar la composición de la matriz (enocianina 1), es decir las impurezas que son principalmente azúcares y ácidos (anexo 2) eligiendo una fase que no retuviera a dichos componentes y que si lo hiciera con las antocianinas o viceversa.

La técnica consiste en hacer pasar la muestra por un soporte sólido donde el analito se queda adsorbido preferentemente en la superficie permitiendo eliminar las impurezas mediante un lavado selectivo para posteriormente eluir con un disolvente de polaridad semejante a la del soluto (50). La separación de los compuestos se lleva a cabo de acuerdo a los principios de la cromatografía.

Una vez tratada la muestra sigue el análisis de las antocianinas y los métodos más utilizados se describen brevemente a continuación.

1.5.1 Determinación del Color en Vinos Tintos

Para la determinación del color rojo de los vinos se ha utilizado el método de Sudraud (51), obteniendo curvas de absorción como función del añejamiento, que es la causa esencial de la pérdida de color. Los vinos rojos jóvenes, tienen un máximo de absorción a 520 nm, debido a las antocianinas de las uvas que son las verdaderas responsables del color rojo. Con los años, el máximo de 520 nm tiende a desaparecer, cayendo a un pequeño hombro en vinos más viejos (>10 años). Esto corresponde al incremento de color amarillo (absorción a 420 nm) que explica porque el rojo se torna a rojo-naranja (Figura 5). La relación de

absorbancias de 420/520 es inferior a 0.7 en los vinos tintos jóvenes, mientras que alcanza 1.7 en los tintos viejos con tonos ladrillo (21). La suma de las absorbancias a 420 y 520 nm es una expresión satisfactoria de la intensidad de color y con esto se permite comparar la cantidad de antocianinas entre varios procesos, como vinificación, almacenamiento y añejamiento (5).

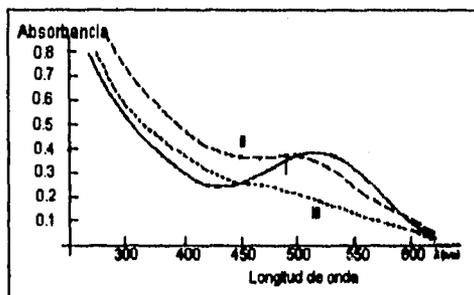


Figura 5. Espectro de Absorción de 3 vinos tintos: I. vino tinto de 1 año; II. vino tinto de 10 años; III. vino tinto de 50 años.

1.6.2 Electroforesis

Las antocianinas son de naturaleza iónica (dependiente del pH) por lo que debe esperarse su movilidad dentro de un campo eléctrico. Sin embargo no ha sido muy utilizada para el estudio de las antocianinas ya que no ofrece ventajas sobre CP y CCF (12).

1.6.3 Cromatografía

La cromatografía es una técnica de separación donde la transferencia de especies se lleva a cabo por medio de procesos de equilibrio que implica la transferencia y distribución de los compuestos entre dos fases distintas, generalmente no miscibles.

La separación de los compuestos puede llevarse a cabo solamente si hay diferencia entre sus distribuciones.

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar de dos modos, el primero se basa en la forma de como se ponen en contacto las fases: cromatografía en columna y cromatografía plana. La otra clasificación se basa en el tipo de fase móvil y en la clase de equilibrios implicados en la transferencia de los solutos entre las fases: cromatografía de líquidos, cromatografía de gases y cromatografía de fluidos supercríticos (52).

1.6.3.1 Cromatografía en Papel y en Capa Fina

Pionero en el análisis de antocianinas por cromatografía en papel (CP) fue el estudio realizado por Ribéreau-Gayon (5), donde se muestra por primera vez la separación del grupo de antocianinas con monoglucósidos y el grupo de antocianinas con diglucósidos así como una representación gráfica de la separación individual de las antocianinas de la uva (Figura 6). A partir de entonces se ha hecho investigación al respecto y en la literatura se pueden encontrar los R_f y los sistemas de elución de la separación de antocianinas, por ejemplo, de antocianinas aciladas (35, 38, 53), de uvas (5), etc.

La cromatografía en capa fina (CCF) tiene ventajas en tiempo de análisis sobre la cromatografía en papel, pero tiene el inconveniente que la cantidad de muestra "cargada" es muy pequeña. Desafortunadamente los valores de R_f reportados no son muy confiables, tanto en CCF como en CP por la diferencia en grosor de la película de placa a placa así como la poca uniformidad en la superficie del papel.

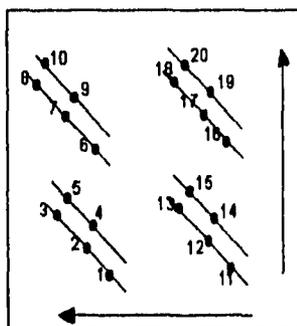


Figura 6

1-5 Antocianinas diglucósido
 6-10 A. acetil- glucósido
 11-15 A. monoglucósido
 16-20 A. acetil-monoglucósido

El orden ascendente de numeración es en todos los casos:
 Delfinidina, Petunidina, Malvidina,
 Cianidina, Peonidina.

Existe una gran cantidad de documentos que ofrecen una buena discusión del uso de los diferentes disolventes que se han usado para la separación de antocianinas con estas técnicas (12).

1.6.3.2 Cromatografía en Columna Abierta

Se usa para la separación y cuantificación de antocianinas a mayor escala. Los materiales de soporte más utilizados incluyen al óxido de aluminio, celulosa, resinas de intercambio iónico, gel de Sephadex y poliamida (7, 12). Así como los mencionados en la parte de purificación de antocianinas.

1.6.3.3 Cromatografía de Gases

La Cromatografía de Gases (CG) es una técnica de separación en columna basada en la interacción diferencial de los componentes de la muestra con la fase estacionaria. Los componentes de la muestra son transportados por la fase móvil, que es un gas inerte comúnmente llamado gas acarreador.

A lo largo de la columna se tiene una gran cantidad de equilibrios entre cada componente con las fases móvil y estacionaria. El compuesto que interactúa más fuertemente con la fase estacionaria se tarda más tiempo en emerger de la columna (54).

Como se mencionó anteriormente las antocianinas son lábiles, de alto peso molecular y con grupos funcionales polares, por lo que para analizarlas por cromatografía de gases es necesario formar un derivado para modificar y mejorar su volatilidad y estabilidad. La silanización es un ejemplo del procedimiento de derivatización que es ampliamente usado para modificar la volatilidad y estabilidad de los solutos. Los derivados silanizados, como el trimetilsilil (TMS) se han empleado para mejorar la volatilidad de compuestos orgánicos polares (58). Compuestos que contienen hidrógenos activos (OH y NH₂) pueden incrementar dramáticamente su peso molecular después de la derivatización (55) sin embargo, se aumenta su volatilidad al reducir la interacción de los puentes de hidrógeno.

En este proyecto se trabajó el modo de inyección en columna (on-column) que es un sistema de inyección que contribuye a eliminar la discriminación y aumenta la estabilidad de esta clase de compuestos. En este sistema de inyección la muestra es colocada dentro de la columna a una temperatura ambiente o ligeramente superior a la temperatura del disolvente por lo que es vaporizada por el incremento gradual de la temperatura del horno (55).

Se han publicado pocos trabajos por Cromatografía de Gases Capilar (CGC) para el análisis de antocianinas; y sólo uno por CGC acopiado a espectrometría de masas, formando un derivado de antocianinas con trimetil clorosilano (TMCS) y hexametil disilazano (HMDS) (56-57).

1.5.3.4 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia

La separación en Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) está basada en la interacción del analito con la fase móvil y estacionaria, a diferencia de la CG, la fase móvil en este caso sí interactúa con la muestra. En general, está basada en los mismos principios que la cromatografía de gases.

En cromatografía de líquidos cuando la fase estacionaria es polar se le denomina fase normal y cuando es no polar, cromatografía en fase inversa.

De acuerdo a la literatura CLAE es la técnica más utilizada para el análisis de antocianinas (13, 18, 25-32, 39, 42, 44, 56-57, 59-61, 64), debido a que no se necesita tratamiento previo de la muestra (formación de derivados), se trabaja a temperatura ambiente evitando su degradación térmica, así como la selectividad en la detección (sólo se detectan las especies que absorben a una longitud de onda determinada en un detector UV-Visible).

Se ha realizado el análisis de antocianinas utilizando cromatografía en fase inversa, en donde la fase móvil comúnmente utiliza mezclas de disolventes como metanol, acetonitrilo y agua con pH's bajos como 1.5 o menores (13, 18, 26, 27, 29, 32, 42, 47, 49, 56, 57, 68) utilizando para ello en general ácido acético y ácido fórmico al 15% y 10% respectivamente (13, 18, 25, 26, 27, 29, 30, 39, 42, 43, 47, 56, 57, 59) siendo poco recomendables en porcentajes tan altos cuando se realiza cromatografía de fase inversa, porque se corre el riesgo de que los grupos octadecilsilano (ODS) de la sílica sean hidrolizados (27, 48). Para evitar lo anterior y considerando que la estabilidad de las antocianinas es mayor cuando se encuentran en su forma ionizada se trabajó cromatografía de líquidos con pares de iones.

La cromatografía de pares de iones (o de formación de parejas de iones) es un tipo de cromatografía de reparto, en fase inversa que se utiliza para la separación y determinación de especies iónicas. El contra-ion es un ion que se combina con el ion analito para formar una pareja de iones, que forma una especie neutra y separable dentro de la columna (52). Sin embargo, el mecanismo no está elucidado completamente.

La cromatografía de pares de iones se usa cuando alguno o todos los componentes de la muestra están ionizados y por lo tanto pueden interactuar con el contra-ion. Esto significa que la retención y separación selectiva se ve afectada por las características de la fase móvil, como son pH, contra-ion, concentración del contra-ion y la fuerza iónica (63).

La cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos son los dos métodos propuestos para el análisis de antocianinas en esta investigación.

2. Desarrollo Experimental

Debido a que los estándares no se encuentran disponibles comercialmente, en la primera parte del proyecto se hizo la purificación de los pigmentos por Extracción en Fase Sólida, obteniéndose 4 fracciones de diferente color. Se partió de dos extractos de uva, uno comercial y otro obtenido en el laboratorio, así como dos mostos, obtenidos de una casa vinícola.

En la segunda parte se desarrolló un método cromatográfico para el análisis de antocianinas en vinos tintos. El primer método propuesto fue por Cromatografía de Gases Capilar a Alta Temperatura (CGC-AT) ya que presenta ventajas como sensibilidad, buena resolución, reproducible y tiempo de análisis corto. En esta parte del proyecto se procedió a establecer las condiciones cromatográficas de análisis. Se partió del procedimiento descrito por Bombardelli (56) en el cual se utiliza una columna capilar SE-52, formando el derivado sililado de antocianinas con TMCS y HMDS. En esta investigación se utilizó una columna de fase estacionaria similar a la utilizada por Bombardelli y también se formó el derivado silanizado de antocianinas modificándose el programa de temperatura y utilizando un sistema de Inyección en columna. Las pruebas se hicieron con extractos de uva y se asignó a la Enocianina 1 como estándar secundario ya que se conocía su composición al estar descrito por Hong & Wrolstad (32).

Como segunda alternativa se propuso la determinación por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) en fase inversa (siendo la técnica más utilizada) y tercero, CLAE en fase Inversa por Pares de Iones, donde igual que antes se buscaron las condiciones cromatográficas para el análisis. La metodología empleada para el análisis fue CLAE por pares de iones, donde la asignación de identidades en los vinos se hizo con el estándar secundario y donde se estudiaron los perfiles de los extractos y vinos tintos, así como las fracciones obtenidas en la etapa de purificación.

Se practicó la prueba de Arata, que sirve para detectar la adición de colorantes artificiales, a muestras que se sospechó tenían la adición de colorante.

Para complementar el estudio de antocianinas se llevó a cabo el análisis espectrofotométrico en vino tinto con el fin de relacionar el contenido de antocianinas con la edad del vino, así como evaluar indirectamente las condiciones de almacenamiento de las muestras.

2.1 Reactivos

Acetonitrilo y metanol de Mallinckrodt AR®, Mallinckrodt Specialty Chemicals Co. Kentucky. Hexametil disilazano (HMDS) de Pierce Chemical Co., Rockford IL., USA. Trimetil clorosilano (TMCS) y sulfato ácido de tetrabutil amonio de Aldrich Chemical Co. Inc. Milwaukee Wis. 2,2,4 trimetilpentano (isooctano), tolueno, ácido clorhídrico, amoníaco, agua grado HPLC y piridina de J.T. Baker S.A de C.V. Xalostoc, México. Acido o-fosfórico de Merck-México, S.A. de C.V. Glucosa, fructosa, sacarosa y arabinosa de Merck, Darmstadt. Cartuchos de fase inversa C-18 de octadecil y fase normal de sílica y florisil de 500 mg de Supelco, INC USA. Agua destilada.

2.2 Estándares

Se utilizaron como estándares extractos de uva que incluyen en su composición las antocianinas en estudio. Se enlista a continuación las muestras utilizadas.

Extracto de uva comercial (Grape Skin Extract o Enocianina) de dos procedencias; Enocianina 1 (España) y Enocianina 2 (Francia), donados por Spectrum, S.A. de C.V., cuya clasificación se encuentra en Food and Drug Administration (FDA) capítulo 21, § 73.170 (61) y por la Comunidad Europea bajo el número E-163 (62) (anexo 1). Extracto de uva no comercial obtenido de hollejo de uva tinta de mesa. Dos mostos de las variedades Rubired (Mosto 1) y Petit Syrah (Mosto 2), cosecha 1994 procedentes de la zona vinícola del Valle de Calafia, en Baja California. Donados por la casa vinícola Pedro Domecq.

2.3 Muestras

Tabla 3. *Vinos Tintos Analizados*

No de muestra	° G.L.	Región	Año de cosecha	Cepa
1	12.5	La Rioja, España	1989	no especificada
2	11.5	Bordeaux, Francia	1992	no especificada
3	12.0	Loire, Francia	1992	no especificada
4	13.0	California, E.U.A.	1988	Cabernet Sauvignon
5	12.0	Burgundy, Chile	1992	no especificada
6	12.0	Valle del Maipo, Chile	1992	Pinot
7	12.0	Valle del Maipo, Chile	1993	Cabemet
8	12.6	Valle de Calafia, B. California	1992	Cabernet Sauvignon
9	12.6	Valle de Guadalupe, B.C.	8años/comprado	no especificada
10	12.0	Valle de Calafia, B. California	1987	no especificada
11	8.8	Valle de Guadalupe, B.C.	recién comprado	no especificada
12	10.0	Valle de Calafia, B. California	8años/comprado	no especificada
13	12.5	Tijuana, B. California	recién comprado	Cabernet Sauvignon
14	8.0	Parras, Coahuila	recién comprado	no especificada
15	12.6	Ciénegas, Coahuila	recién comprado	no especificada
16	11.0	San Juan del río, Querétaro	recién comprado	Cabernet Sauvignon

2.4 Metodología

2.4.1 Purificación de Antocianinas

Como se fundamentó en los antecedentes (sección 1.5), la purificación de antocianinas se realiza por EFS. El cartucho C-18 se acondiciona previamente a la aplicación de la muestra, favoreciendo de esta manera la apertura de las cadenas hidrocarbonadas, incrementándose el área superficial disponible para la interacción con el analito, así como la eliminación de cualquier tipo de impurezas y material residual (50). Posteriormente se hace pasar agua para remover el exceso del disolvente de acondicionamiento (Tabla 4). Se aplica la muestra en el cartucho (variando el volumen dependiendo de la muestra, Tabla 5) enseguida se lava con agua para remover las impurezas y finalmente se eluyen las fracciones con disolventes de diferente polaridad. Cada fracción se evapora a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se almacena tapada en refrigeración hasta el momento de su análisis.

Las condiciones finales seleccionadas para la purificación de antocianinas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Acondicionamiento y purificación.

Etapa	Disolvente
* Acondicionamiento	CH ₃ CN/H ₂ O (1:1 v/v)
* Lavado	1. H ₃ PO ₄ al 0.10% acuoso 2. H ₂ O destilada
** Elución	1. CH ₃ CN 2. CH ₃ CN/MeOH (1:1 v/v) 3. MeOH 4. CH ₃ CN/H ₃ PO ₄ al 20% (1:1 v/v)

Tabla 5. Tratamiento de las muestras.

Muestra/etapa	Acondi- cion.	Muestra		Elución				
		Lavado 1	Lavado 2	Fracción 1	Fracción 2	Fracción 3	Fracción 4	
		V O L U M E N		M I L L I L I T R O S				
Encocianina 1	4.0	3.0	2.0	9.0	2.0	3.0	1.5	2.5
Encocianina 2	4.0	3.0	2.0	9.0	1.5	3.0	1.5	2.0
Mosto 1	4.0	3.0	2.0	9.0	2.0	2.5	2.5	-----
Mosto 2	4.0	3.0	2.0	9.0	1.5	3.0	1.5	2.0
Ext. de uva	4.0	2.0	2.0	9.0	2.0	5.0	1.0	2.5
Muestra 1	4.0	6.0	2.0	9.0	1.5	2.5	1.5	2.0
Muestra 2	4.0	6.0	2.0	9.0	1.5	2.5	2.0	2.0
Muestra 4	4.0	6.0	2.0	9.0	2.0	3.0	1.0	2.0
Muestra 10	4.0	6.0	2.0	9.0	1.5	2.5	1.5	2.0
Muestra 13	4.0	6.0	2.0	9.0	2.5	3.0	2.0	2.0
Muestra 14	4.0	6.0	2.0	9.0	2.0	3.0	2.5	-----

* Los volúmenes de acondicionamiento, lavado 1 y 2 fueron constantes en todos los experimentos.

**Dependiendo de la muestra se variaron la cantidad de muestra y los volúmenes de elución, ya que la concentración de antocianinas en cada caso era diferente.

2.4.2 Obtención de Extracto de Uva no Comercial

El extracto de uva tinta no comercial se prepara según la metodología reportada por Wulf & Nagel (27), donde se extraen antocianinas de uvas de *Vitis vinifera*.

Se colocan en una licuadora a la velocidad más baja durante 1 minuto, 60 g de hollejo y 100 ml de ácido fórmico al 1% en metanol. El extracto así obtenido se filtra en un buchner y con los sólidos restantes se hace una segunda extracción con 50 ml más de la solución de ácido fórmico. Se juntan los dos extractos y se

concentra a aproximadamente 15 ml en un rotavapor a presión reducida, Büchi waterbath B-480/R-114. Manteniendo una temperatura menor de 20°C para evitar la degradación de antocianinas.

2.4.3 Cromatografía de Gases Capilar a Alta Temperatura

Condiciones cromatográficas. Cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 5890 serie II, equipado con detector de ionización de flama e inyector en columna (on-column) con integrador Hewlett Packard 3396A. Columna capilar de sílice fundida Aluminium-clad (Quadrex Corporation), de 15m x 0.25mm D.I., 0.1µm metil silicón. Programa de Temperatura: 40°C Incrementando 15°C/min hasta 340°C sostenido por 15 minutos.

Cromatografía de Gases Capilar Espectrometría de Masas (CGC/EM)

Condiciones cromatográficas. Cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 5890 serie II, acoplado a un detector de masas Hewlett Packard modelo 5971. Fuente de ionización de impacto electrónico. Rango de m/z de 50 a 550. Columna capilar DB-1, de 25m x 0.25mm D.I., 0.25µm de espesor de película. Programa de Temperatura: 50°C incrementando 10°C/min hasta 300°C sostenido por 15 minutos.

Derivado. Se coloca la muestra seca en un viaj de reacción con sello de teflón. Se disuelve con 250µl de piridina, y se adicionan 200µl de HMDS y 100µl de TMCS. Se calienta a 80°C por 30 min. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se inyecta 0.5 µl del sobrenadante.

2.4.4 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia en Fase Inversa

Condiciones Cromatográficas. Cromatógrafo de líquidos Waters Associates, Milford, MA. Detector UV-Visible con longitud de onda variable Waters 484. Bombas Waters 510, con inyector Rheodyne (20 μ l de loop) integrador Waters 746. Columna μ Bondapak C-18 de 300 x 3.9 mm y 10 μ m de tamaño de partícula (Waters Associates).

Se utiliza un sistema isocrático para la elución, donde la fase móvil consiste de H₃PO₄ 4% acuoso/ CH₃CN (80:20 v/v). Las muestras se inyectan sin tratamiento previo. Flujo 1.5 ml/min y detección a una λ = 520 nm.

2.4.5 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia por Pares de Iones

Condiciones cromatográficas. Se emplea el mismo equipo que para cromatografía de líquidos en fase inversa además de un gradiente Waters 680.

Se utiliza un sistema binario con gradiente lineal de elución. Comenzando con 10% de la fase móvil A hasta 50% de A en 45 minutos, dejando estabilizar el equipo 15 minutos para hacer la siguiente inyección.

Fase móvil A : acetonitrilo/metanol (1:1 v/v), sulfato ácido de tetrabutil amonio 0.05M y ácido fosfórico al 0.04% (pH=2.0).

Fase móvil B : agua destilada, sulfato ácido de tetrabutil amonio 0.05M y ácido fosfórico al 0.04% (pH= 2.0).

Las muestras en solución se inyectan sin tratamiento previo, y las muestras secas se disuelven en la fase móvil B. Flujo 1.0 ml/min y detección a una λ =520 nm.

2.4.5.1 Análisis Espectrofotométrico

Espectrofotómetro Lambda 2 UV/VIS Perkin Elmer, con celdas de cuarzo de 1cm de espesor.

Se colocan en la celda del espectrofotómetro 4 ml de la muestra en estudio y se hace un barrido en la región del visible desde 425 a 700 nm.

2.4.5.2 Determinación de Colorantes Artificiales (Método de Arata)

Se hierve moderadamente 30 ml de la muestra a analizar, hasta reducir su volumen inicial a dos terceras partes (Parrilla eléctrica Thermolyne Type 1000). Se agregan 4 ml de una solución acuosa de HCl al 10% y un poco de lana cruda previamente desengrasada, prolongando su ebullición por 5 minutos. Después de los cuales se decanta el líquido y se lava la lana en el mismo matraz con agua fría hasta que no hay color en el agua de lavado. Se adicionan 100 ml de agua acidulada con HCl; calentándose a ebullición y se mantiene así durante 5 minutos. Se decanta y se repite el lavado hasta obtener el agua incolora, asegurándose a la vez que se elimina toda acidez de la lana. Posteriormente se adicionan 50 ml de agua y unas gotas de amoníaco, se hierve suavemente durante 10 minutos. Si la lana así obtenida, después de ser lavada con agua fría se tiñe de un rojo evidente, se puede asegurar que el vino fue teñido con colorantes orgánicos de carácter ácido es decir, con derivados azoicos y fucsinas sulfoconjugadas (67).

3. Resultados y Discusión de Resultados

3.1 Purificación de Antocianinas por EFS

Para elegir la polaridad del soporte en la purificación de antocianinas por EFS se hicieron pruebas con cartuchos de fase normal y fase Inversa C-18. Con los resultados obtenidos de ambas fases se eligió a la fase inversa ya que permitió retener selectivamente a las antocianinas (suponiendo que los azúcares y los ácidos no se retienen en esta fase y asegurándose por los lavados de agua y H_3PO_4 al 0.10% su eliminación), permite además mantener estables a las antocianinas con los disolventes probados y se tiene una elución aparentemente selectiva.

Se habla de una elución "aparentemente selectiva" al observar que los colores de las fracciones obtenidas son diferentes, lo que hace suponer la separación individual de antocianinas en cada fracción colectada, aunque con el análisis de estas fracciones se determinó realmente su composición.

Las pruebas de optimización de condiciones se describen enseguida.

Se probaron cartuchos de fase inversa C-18, utilizándose el tratamiento reportado por Amitabh (49), cambiando el disolvente de elución por MeOH/ CH_3CN (1:1 v/v), para facilitar su evaporación, obteniéndose los mismos resultados que por el método original, es decir, una sola banda colorida.

Aunque se separaron las antocianinas de los otros componentes (una sola banda), se deseaba separarlas de una manera selectiva ya que de acuerdo a su composición química tienen diferente polaridad, por lo que se utilizaron disolventes con diferente polaridad observándose varias bandas coloridas bien definidas. En la Tabla 6 se muestran los resultados de esta separación en diferentes fracciones.

Tabla 6. Limpieza en cartucho C-18

No.de fracción	Disolvente	Color
1	CH ₃ CN	rojo oscuro
2	CH ₃ CN/MeOH(1:1v/v)	violeta intenso
3	MeOH	violeta
4	CH ₃ CN/H ₃ PO ₄ 20% (1:1 v/v)	rosa mexicano
5	[CH ₃ CN/H ₃ PO ₄ 20% 1:1 v/v)/MeOH (80:20 v/v)	rosa pálido
6	MeOH/ CH ₃ CN/H ₃ PO ₄ (50:30:20 v/v)	rosa pálido
7	MeOH/ CH ₃ CN/CH ₂ O ₂ (50:30:20 v/v)	rosa pálido

De acuerdo a estos resultados, aparentemente se tiene una separación selectiva de las antocianinas eliminándose los azúcares y ácidos y permitiendo concentrar con facilidad cada una las fracciones eluidas.

Las condiciones finales seleccionadas para la separación y purificación de antocianinas se mostró en la Tabla 4. La elección se hizo en base a que el color y tono de las últimas 3 fracciones era el mismo, pareciendo ser la cola de la 4a fracción, por lo que se simplificó a una, quedando el tratamiento completo con 4 fracciones. Este tratamiento se practicó con los demás extractos y algunos de los vinos tintos.

En general, las muestras no eluyen con los lavados, la excepción fue Encianina 2 que eluye un poco con el lavado de H₃PO₄ e incluso se observa un poco de elución desde que la muestra es aplicada al cartucho C-18 no así Encianina 1 que se fija perfectamente en el cartucho, lo que sugiere una posible diferencia en composición entre ambos extractos.

3.2 Cromatografía de Gases Capilar a Alta Temperatura

Como primer aproximación se trató de predecir el tiempo de retención de las antocianinas. Esto se hizo comparando la estructura de éstas con la estructura de oligosacáridos, como sacarosa. En la Tabla 7 se muestran los tiempos de retención obtenidos y el peso molecular de los derivados de azúcares, así como de malvidina monoglucósido (Mv-3-Ggl), característico de *Vitis vinifera*.

Tabla 7. Tiempos de retención de referencia.

Estándar	Peso molecular (g/mol)	t _r (min)
Glucosa	180	10.55
Fructuosa	180	10.08
Sacarosa	342	15.08
Mv-3 gl	360.3	—

Considerando estos resultados se procedió a establecer un orden de elución a los azúcares y las antocianinas presentes en las muestras. En base a esto, el primer grupo de señales (Figura 7) corresponde a los monosacáridos como glucosa y fructuosa (I), el segundo los disacáridos representados por sacarosa (II), posteriormente los trisacáridos y así sucesivamente.

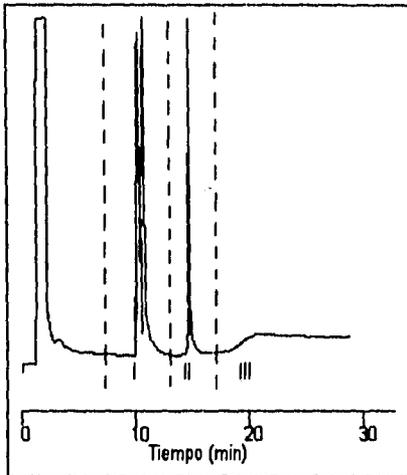


Figura 7. Cromatograma de los derivados silanizados de azúcares.

De acuerdo a la estructura y peso molecular del derivado de malvidina monoglucósido se esperaba que eluyeran en la región de los trisacáridos o en la parte final de los disacáridos.

Se analizaron entonces dos extractos de uva formando previamente el derivado silanizado, observándose que el extracto de uva blanca (Figura 8) muestra dos grupos de señales que corresponden a monosacáridos (grupo I) y disacáridos (grupo II) mientras que el extracto de uva tinta (Figura 9), muestra un tercer grupo que es el que debería corresponder a las antocianinas.

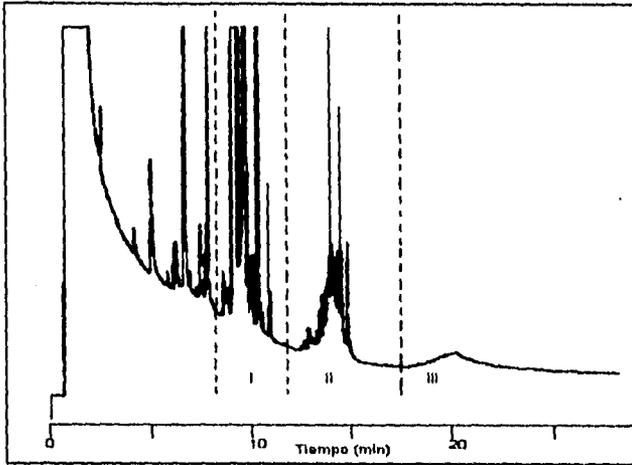


Figura 8. Cromatograma del derivado del Extracto de uva blanca.

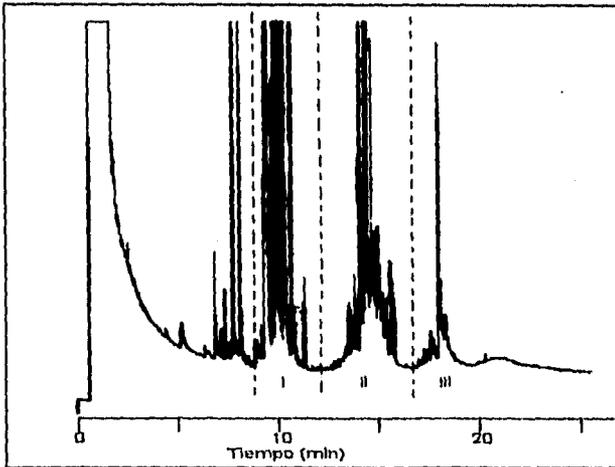


Figura 9. Cromatograma del derivado del Extracto de uva tinta.

Como se esperaba, el extracto de uva blanca no presentó el tercer grupo que es el que correspondería a las antocianinas.

También se analizó el estándar secundario (enocianina 1) observándose la presencia de los grupos I, II y III.

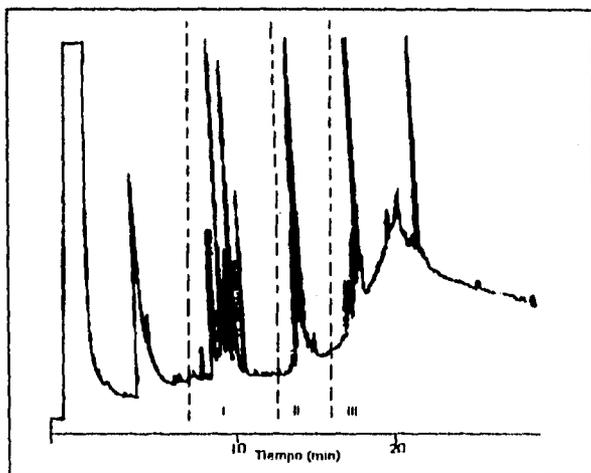


Figura 10. Cromatograma del derivado de Enocianina 1.

En el artículo de Bombardelli (56) la temperatura a la que eluyen las antocianinas es arriba de 290°C por lo que se esperaría que las antocianinas y compuestos mas pesados aparezcan en la región que se ha asignado como grupo III.

Estas muestras se analizaron por cromatografía de gases capilar/espectrometría de masas (Figura 11) obteniéndose diferentes espectros de masas. Desafortunadamente no se observaron los iones fragmento característicos de antocianinas ni el ión molecular (Tabla 8) sin embargo, se identificaron otros componentes como ácido acético, ácido málico, ácido succínico, ácido butanedioico, glicerol, inositol, fructuosa, glucosa, xilosa y manosa, sirviendo ésta identificación para confirmar la asignación de grupos.

Tabla 8. Espectros de masas de algunas antocianinas de uva (56).

Antocianina	Fragmentos del derivado, m/z (%)				
Delfinidin-3-O-glucósido	1111 (2.5)	733 (100)	661(97.5)	450(2.5)	361(28.4)
Cianidin-3-O-glucósido	1023 (1.4)	645(91.2)	573 (100)	450(14.2)	361(42.6)
Peonidin-3-O-glucósido	965 (3.2)	587(82.8)	515 (100)	450(10.7)	361 (28)
Petunidin-3-O-glucósido	1053 (2.3)	675 (100)	803(59.6)	450 (3.1)	361 (13)
Malvidin-3-O-glucósido	995 (4.2)	617(96.4)	545 (100)	450(11.3)	361 (61)

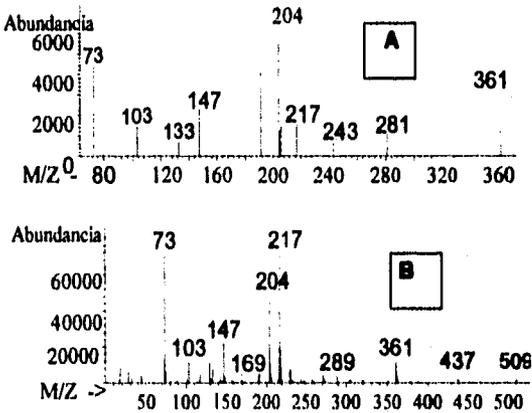


Figura 11. Espectro de masas de una señal de tiempo de retención ubicado en el grupo III de A. Encocianina 1 y B. Extracto de uva tinta.

Debido a que no fue posible hacer la identificación de antocianinas se procedió a realizar la hidólisis de las mismas para liberar al azúcar de las antocianinas y de esta manera tratar de identificarlas.

Para ello se siguió el método reportado por Strack (11) obteniéndose dos fracciones: una amilica que debería contener a las antocianidinas y otra acuosa que debería contener al azúcar. Estas dos fracciones se analizaron por CGC-EM, pudiendo identificar en la fase acuosa azúcares, mientras que en la amilica no se logró observar el ion molecular, pero sí fragmentos que indican anillos

aromáticos (biblioteca) y los últimos fragmentos que se pueden observar son masas muy cercanas al peso molecular de las antocianidinas, desafortunadamente no se tuvo repetibilidad en el análisis.

Uno de los problemas centrales en la determinación de antocianinas por esta vía fue sin duda la falta de estándares.

Aunque después de realizar algunos cambios tanto en las condiciones cromatográficas como en el procedimiento de hidrólisis y formación del derivado se tuvieron pequeños logros, no se logró mejorar totalmente, pues no se obtuvo lo reportado por Bombardelli (55-56). Por lo anterior se decidió intentar esta determinación por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia aprovechando que las antocianinas absorben a una longitud de onda específica en un detector UV-Visible.

Esto no quiere decir que la determinación de antocianinas no se pueda realizar por Cromatografía de Gases, se necesitaría invertir mucho más tiempo, contar con los estándares o tener un equipo de mayor resolución de masas para que al seguir optimizando cada etapa se logre el resultado deseado.

3.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia

Para el análisis se partió de las condiciones cromatográficas reportadas por Amitabh (49) donde la fase móvil (sección 2.4.4) tenía un pH de 1.1 y obteniendo como resultado 4 señales que eluían antes de 4 minutos, no bien resueltas y con pobre repetibilidad. Una segunda fase móvil fue la mezcla de H₂O/AcOH/MeOH (65:15: 20) con un pH de 2.0. Una tercera fase móvil fue la reportada por Williams&Hradzina (60) con un pH de 1.6. En ambos casos no se logró mejorar la resolución ni tener buena reproducibilidad.

Se probaron otras columnas de fase Inversa C-18 (Novapack, Lichrosorb) sin conseguir mejores resultados, por lo que una posible causa de estos resultados pudo ser la inestabilidad de la columna por los valores de pH tan bajos que se estaban utilizando. Por lo anterior se pensó en utilizar la cromatografía en fase inversa de pares de iones aprovechando la estructura iónica de las antocianinas.

Al probar en CLAE por pares de iones las condiciones descritas (sección 2.4.5) se consiguió buena resolución de las principales antocianinas en estudio, así como buena repetibilidad, lo que puede interpretarse como una estabilización de la columna al introducir el contra-ión y aumentar el pH.

De acuerdo a la composición del Extracto del Hollejo de Uva (Grape Skin Extract o Enocianina) reportado por Hong (32) (Figura 12) se asignó la identidad de cada antocianina en el extracto de uva comercial Enocianina 1 (Figura 13).

Con éste perfil, que es característico de *Vitis vinifera* (12, 13, 18, 27, 31, 43, 45, 64) se hizo la asignación de antocianinas en las muestras de vino tinto y en los demás extractos, adicionando enocianina 1 para la identificación de antocianinas monoglucósido.

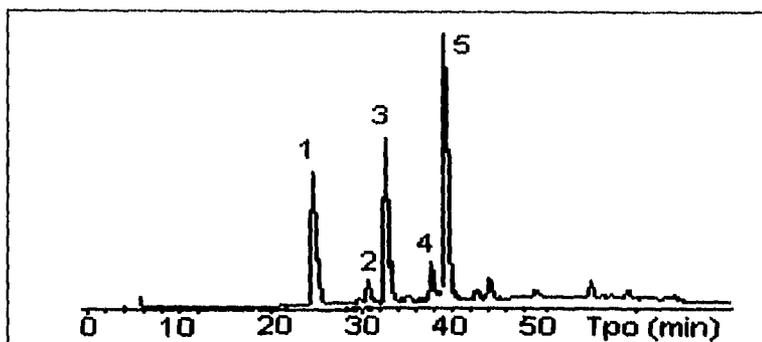


Figura 12. Perfil de Grape Skin Extract reportado por Hong (32). 1. Delfinidina, 2. Cianidina, 3. Petunidina, 4. Peonidina, 5. Malvidina.

En la Figura 13 se muestra el cromatograma obtenido del análisis de una solución de enocianina 1 con una concentración de 3mg/ml, observándose cinco señales que de acuerdo al perfil cromatográfico descrito por Hong (32) son: delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina monoglucósidos.

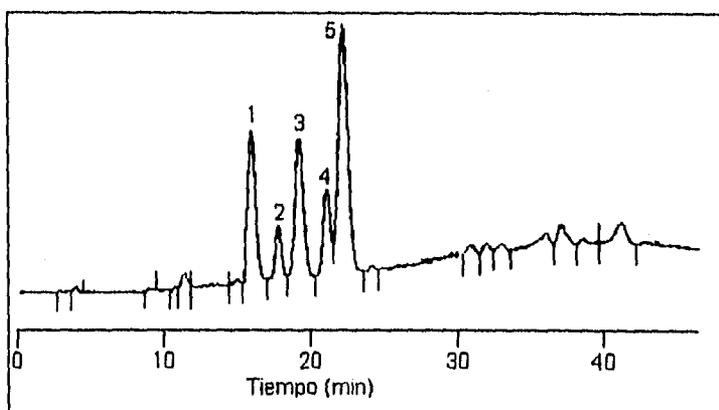


Figura 12. Análisis por CLAE por pares de iones de Enocianina 1. 1. Delfinidina (16.35%), 2. Cianidina (5.07%), 3. Petunidina (16.43%), 4. Peonidina (7.83%), 5. Malvidina (35.88%). Condiciones cromatográficas en el texto. Porcentajes relativos.

La señal de mayor intensidad (Pico 5) sirve para confirmar la presencia de malvidina, que generalmente es la antocianina de mayor proporción reportada en uva de *V. vinifera* (4, 18, 19, 27, 31, 33, 60, 62).

Comparando con enocianina 2, se observa una diferencia en la concentración de antocianinas, siendo necesaria una concentración 3 veces mayor de enocianina 2 para obtener señales (picos) similares a las de enocianina 1. También se puede observar diferencia en sus perfiles cromatográficos es decir, en enocianina 1 se observan únicamente a las antocianinas monoglucósido mientras que en enocianina 2 se presentan otras señales identificadas como malvidin-cafeoil-glucósido y malvidin-cumaril-glucósido (picos 6 y 7 respectivamente). Comprobando con estos resultados, la hipótesis propuesta en la sección 3.1 es decir, que existe diferencia en la composición de los dos extractos comerciales (Figura 14).

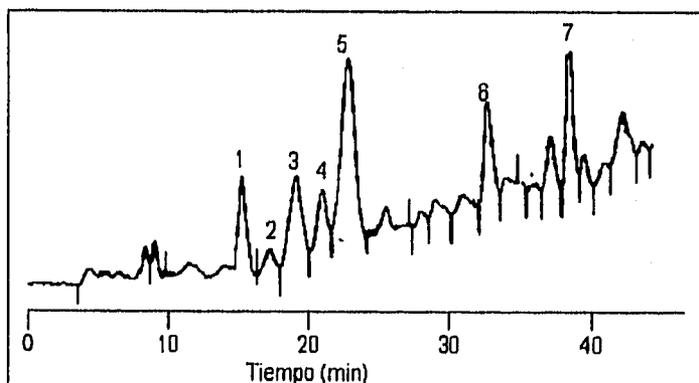


Figura 14. Análisis por CLAE por pares de Iones de Enocianina 2 (10 mg/ml). 1. Delfinidina (7.62%), 2. Cianidina (1.38%), 3. Petunidina (9.34%), 4. Peonidina (4.43%), 5. Malvidina (17.55%), 6. Malvidin-cafeoil-glucósido (4.92%), 7. Malvidin-cumaril-glucósido (7.91%). Condiciones cromatográficas en el texto. Porcentajes relativos.

En el análisis de mosto 1 se observa una composición diferente a todas las demás muestras analizadas observándose una sola señal que tiene un área de 62% del total, en un tiempo de retención de 18.02 min.

La Figura 15 muestra el análisis de mosto 2, identificándose los 5 monoglucósidos de antocianinas, así como a los derivados de malvidina. Sin embargo, cianidina monosacárido se encuentra casi en la misma proporción que malvidina monoglucósido, aunque éste sigue siendo el principal componente, lo que verifica que las diferentes cepas dentro de *V. vinifera* tienen un perfil diferente.

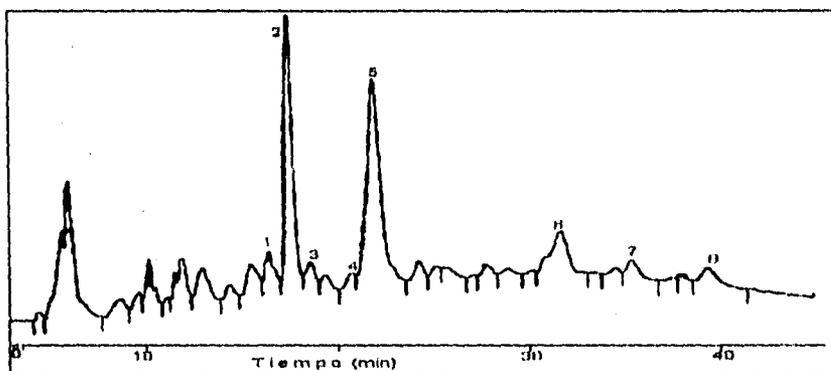


Figura 15. Análisis por CLAE por pares de iones de Mosto 2 (Petite Syrah), 1. Delfinidina (3.3%), 2. Cianidina (11.08%), 3. Petunidina (2.25%), 4. Peonidina (1.8%), 5. Malvidina (16.77%), 6. Malvidin-acetil-glucósido (8.95%), 7. Malvidin-cafeoil-glucósido (3.9%), 8. Malvidin-cumaril-glucósido (3.7%). Condiciones cromatográficas en el texto. Porcentajes relativos.

El extracto de uva no comercial (Figura 16) muestra el mismo perfil de antocianinas características de la uva sin embargo, no corresponde a las proporciones de *Vitis vinifera* es decir, malvidina monoglucósido (pico 5) no se encuentra en mayor proporción, en este caso es peonidina monoglucósido (pico 4) la que predomina. Además no aparece la señal de malvidin-acetil-glucósido, sino únicamente el de malvidin-cafeoil-glucósido (pico 6), así como malvidin-cumaril-glucósido (pico 7).

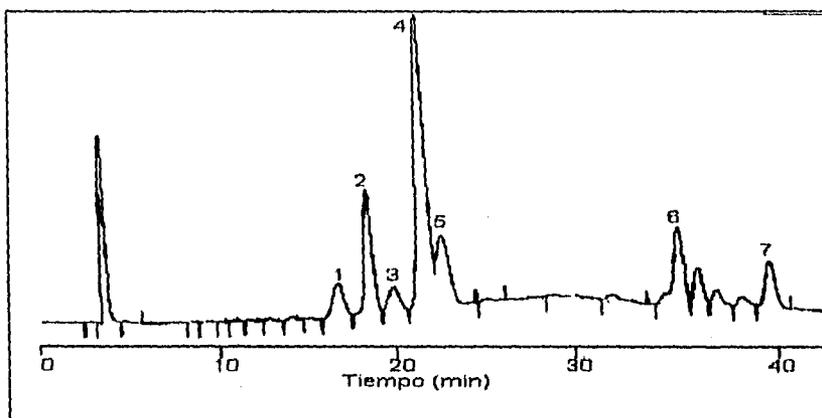
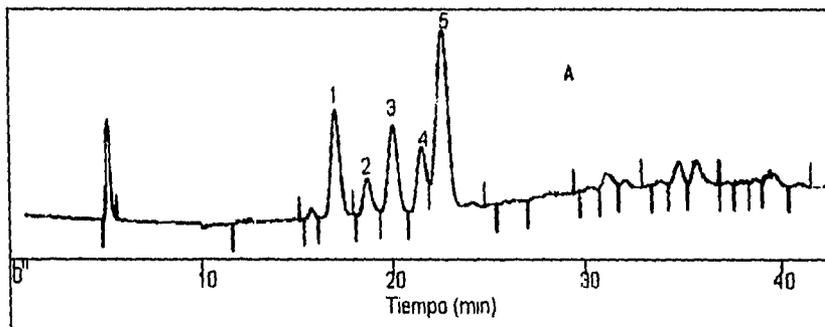


Figura 16. Análisis por CLAE por pares de Iones de Extracto de uva tinta no comercial 1. Delfinidina (4.24%), 2. Cianidina (12.57%), 3. Petunidina (3.14%), 4. Peonidina (35.5%), 5. Malvidina (9.79%), 6. Malvidin-cafeoil-glucósido (8.17%), 8. Malvidin-cumaril-glucósido (5.26%). Condiciones cromatográficas en el texto. Porcentajes relativos.

Bajo las mismas condiciones se analizaron las 4 fracciones obtenidas en la etapa de purificación (sección 3.1) de Encocianina 1 (Figura 17), observándose que eluye la mayor parte de antocianinas (63.7%) en la fracción 2. En la 4a fracción se observa una señal significativa que podría tratarse de los productos de la degradación de antocianinas debido a que el eluyente utilizado contiene 20% de ácido fosfórico.



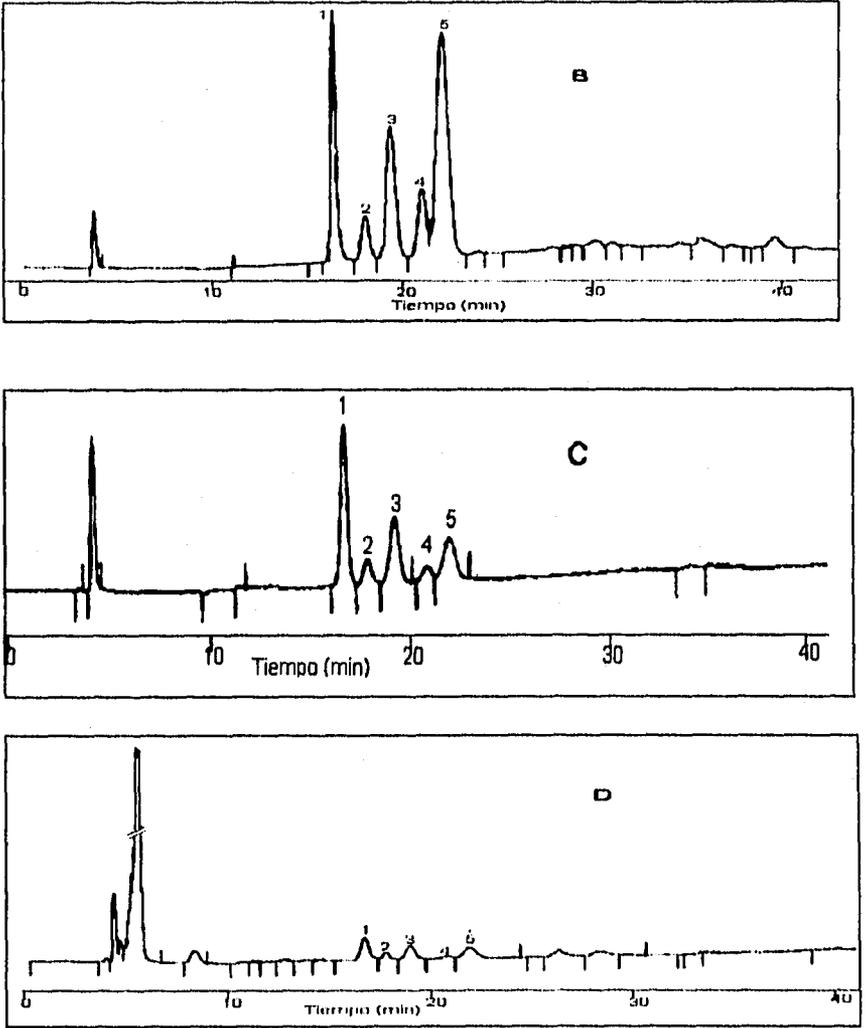
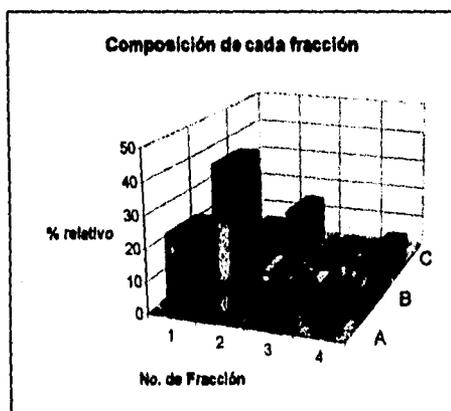
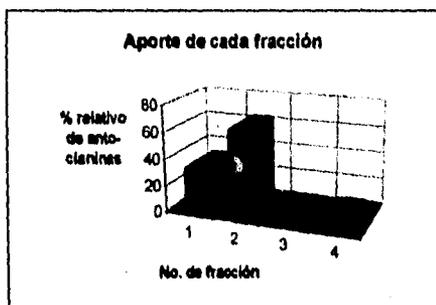


Figura 17. Análisis por CLAE por pares de iones de las fracciones de Enocianina 1
 A. Fracción 1, B. Fracción 2, C. Fracción 3, D. Fracción 4. Condiciones de elución en la
 Tabla 4.

La Figura 18 muestra graficamente la composición relativa de antocianinas identificadas en las cuatro fracciones obtenidas de la enocianina 1.



A= Antocianinas monoglucósido
 B= Derivados acilados de antocianinas
 C= Otros (no identificados)

Figura 18. Porcentajes relativos de las fracciones de Enocianina 1.

Con la metodología de purificación se buscaba obtener a cada antocianina individualmente sin embargo al analizar las fracciones la composición no fue la esperada. Lo que en realidad contiene cada fracción es una mezcla de todas las antocianinas presentes en el extracto, aunque concentradas en la fracción 1.

La Tabla 9 resume los resultados de la composición de las fracciones de las muestras a las que se les aplicó el tratamiento. El comportamiento general observado es que la fracción eluida con acetonitrilo (fracción 1) concentra la mayor proporción de pigmentos y eluyen tanto los monoglucósidos como los derivados acilados en mayor cantidad. Lo que se observa en las fracciones 2, 3 y 4 es que terminan de eluir las antocianinas de la fracción 1 pues la concentración va disminuyendo.

La Enocianina 1 y la muestra 14 presentaron un comportamiento diferente ya que concentran en la fracción 2. La Enocianina 2 concentra a las antocianinas monoglucósido en la fracción 2 y a los derivados acilados en la fracción 1.

Tabla 9. Composición de las fracciones obtenidas en la etapa de purificación, expresado en % relativos.

	FRACCION 1 (PORCENTAJES)				FRACCION 2 (PORCENTAJES)				FRACCION 3 (PORCENTAJES)				FRACCION 4 (PORCENTAJES)			
	C. al T.	MONG	DER	OTROS	C. al T.	MONG	DER	OTROS	C. al T.	MONG	DER	OTROS	C. al T.	MONG	DER	OTROS
ENOC 1	30.48	23.23	2.27	4.96 d	62.65	45.36	3.13	14.06 d	2.14	1.88	0.01	0.46 d	4.76	0.88	0	3.88 pd
ENOC 2	51.29	10.27	13.84	27.44	42.81	15.74	7.72	19.34	1.31	0.89	0.23	0.19 d	4.59	0.26	0.38	3.93 pd
MOSTO 2	75.81	26.78	15.89	33.23-d	16.15	3.52	3.24	9.38 d	2.82	1.73	0.78	0.32 d	5.20	0.56	0.07	4.58 pd
EXT. UVA	66.17	44.04	12.87	9.55-d	31.39	27.46	2.32	1.6 d	1.42	1.18	0.07	0.16 d	0.99	0.46	0.01	0.52 pd
1	76.44	4.20	9.89	62.76	18.56	3.13	4.24	11.18 d	0.53	0.11	0.12	0.29 d	4.45	0.16	0.43	3.85 pd
2	68.52	24.25	20.05	24.23	31.01	7.16	7.85	15.96					0.46	0.08	0.12	0.24 pd
4	75.93	17.05	28.85	32.82-d	17.33	4.67	7.41	5.25 d	0.75	0.28	0.34	0.12 d	5.96	0.49	0.67	4.8 pd
10	62.65	9.05	19.05	19.67	3.23	0.88	1.18	0.47	10.15		2.71	7.44 d	3.95	0.10	0.35	3.49 pd
13	73.79	11.06	15.44	19.13	20.84	2.42	4.18	9.62 d	0.13	0.05	0.02	0.05 d	5.29	0.03		5.25 pd
14	23.20	13.54	2.12	7.53-d	52.34	28.45	7.88	18.06-d	24.40	15.61	2.72	6.07-d				

C. al T. =contribución de esa fracción al porcentaje total (que es la suma de las 4 fracciones)

MONOG.= porcentaje de antocianinas con monoglucósidos

DER. = porcentaje de derivados de malvidina

OTROS= porcentaje de otras antocianinas no identificadas

d= en cantidad despreciable, ya que son muchos picos pero muy pequeños y ~d significa más o menos despreciable, es decir, que no son importantes para tomarse en cuenta.

p.d= significa que son productos de degradación de la fracción, por el medio ácido manejado en la elución.

La cantidad encerrada en una elipse representa la fracción de mayor contribución al total de las 4 fracciones.

La que se encuentra en un arco arriba de la cantidad numerica representa la fracción con el mayor contenido de monoglucósidos y el arco por abajo de la cantidad significa la fracción con el mayor contenido de derivados de malvidina de las 4 fracciones de cada muestra.

Los resultados del análisis de los vinos tintos se resumen en la Tabla 10 y a continuación se ilustra el cromatograma de la muestra 14 que presenta el perfil de antocianinas de *Vitis vinifera*.

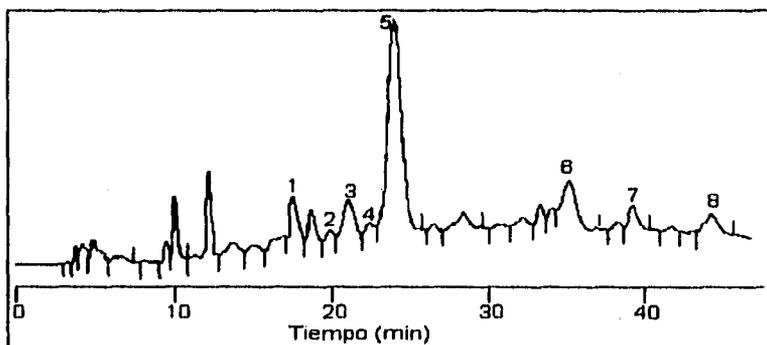


Figura 19. Análisis por CLAE por pares de iones de la muestra 14. 1. Delfinidina (6.5%), 2. Cianidina (1.1%), 3. Petunidina (5.9%), 4. Peonidina (1.6%), 5. Malvidina (35.3%), 6. Malvidin-acetil-glucósido (8.5%), 7. Malvidin-cafeoil-glucósido (2.4%), 8. Malvidin-cumaril-glucósido (3.5%). Condiciones cromatográficas en el texto. Porcentajes relativos.

De las 9 muestras nacionales analizadas solo las muestras 8,13,14 y 16 presentaron el perfil completo de antocianinas. Las muestras 9,12, 15 y 16 presentaron una señal diferente al perfil esperado (Figura 20). Esta señal eluye a un tiempo de retención de 27.5 min y se encuentra en una concentración significativa. Esta señal sugiere la presencia de antocianinas de uva híbrida o la posible adición de algún colorante aunque por la concentración encontrada es más probable que sea debida a la adición de colorante. Para verificar esto último se procedió a realizar la prueba de Arata en las muestras que presentaron dicha señal y cuyos resultados se encuentran en la sección 3.3.2.

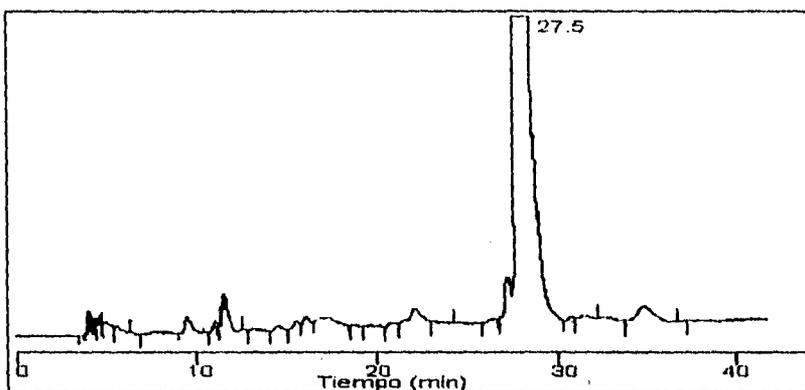


Figura 20. Análisis por CLAE por pares de iones de la muestra 15.

El perfil de vinos importados se ilustra con la muestra 2 (Figura 21). En este caso como se muestra en la Tabla 10 están presentes las antocianinas monoglucósidos y los tres derivados de malvidina, variando su concentración y manteniendo el orden de elución esperado.

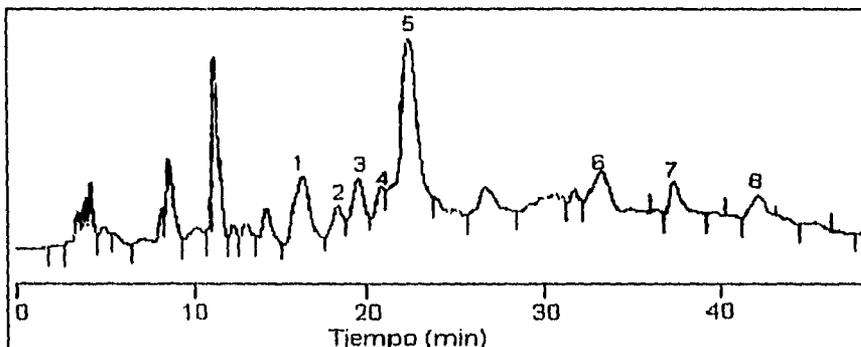


Figura 21. Análisis por CLAE por pares de iones de la muestra 2, 1. Delfinidina (4.6%), 2. Cianidina (2.7%), 3. Petunidina (4.6%), 4. Peonidina (2.5%), 5. Malvidina (19.2%), 6. Malvidin-acetil-glucósido (8.5%), 7. Malvidin-cafeoil-glucósido (4.7%), 8. Malvidin-cumaril-glucósido (3.2%) . Condiciones cromatográficas en el texto. Porcentajes relativos.

De las muestras importadas hubo una muestra que presentó la señal no identificada ($t_r=27.5$ min) a pesar de que el nombre del vino indica que es de Cabernet, no especifica la variedad surgiendo la duda del origen de la uva y si es éste el factor que origina tal señal, sospechándose la posible adición de colorante.

Dentro de las aplicaciones del perfil cromatográfico se cuenta principalmente con la verificación de la presencia de antocianinas diglucósido en vinos tintos, con el fin de saber si pertenece a *Vitis vinifera* sin embargo, se debe contar con los estándares de los mismos y más aún si es que se pretende la determinación sea para detectar esta adulteración, pues las señales observadas antes del grupo de antocianinas monoglucósido pueden ser antocianinas diglucósido pero también fragmentos de moléculas de antocianinas.

Otra aplicación del perfil cromatográfico es la autenticación de cepas es decir, la comprobación de la cepa que se declara en la etiqueta fue elaborado el vino. Por ejemplo, comparando los cromatogramas de las muestras 4, 8 y 13 se encuentra que pueden superponerse perfectamente por lo que en este caso podemos verificar que las tres se elaboraron a partir de la misma variedad. Aunque para certificar que se trata de Cabernet Sauvignon (declarado así en la etiqueta) se necesita de la cepa estándar, se hizo la comparación del perfil encontrado en este estudio que es el mismo que el publicado en la literatura (Figura 22) y se observa que tienen el mismo orden de elución y composición (Figura 23).

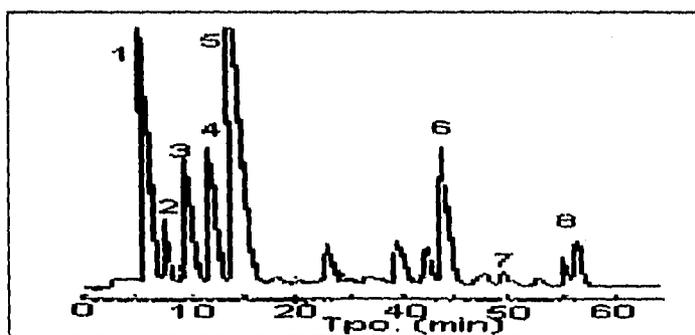


Figura 22. Perfil publicado (30) de vino tinto de cepa Cabernet Sauvignon.

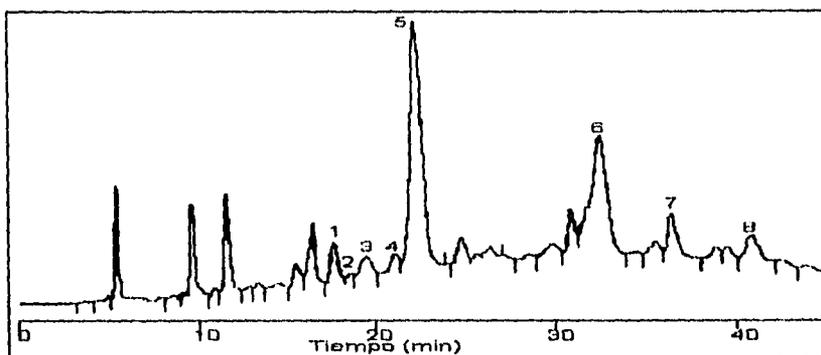


Figura 23. Perfil de muestra 4, declarado en la etiqueta que es varietal de Cabernet Sauvignon.

En las dos últimas figuras (22 y 23) la asignación de identidades es 1. Delfinidina, 2. Cianidina, 3. Petunidina, 4. Peonidina, 5. Malvidina, 6. Malvidina acetil-glucósido, 7. Malvidina cafeoil-glucósido y 8. Malvidina cumaril-glucósido.

De acuerdo al perfil obtenido en las muestras analizadas, se pudo observar que el mosto de uva Petite Syrah y las muestras de vino 1-6, 8, 13 y 14 tienen el perfil completo de antocianinas y se encuentran en las proporciones establecidas de *Vitis vinifera*. Mientras que el extracto de uva tinta no comercial presentó el perfil de uva, pero no en las proporciones de *Vitis vinifera*.

Las muestras 10 y 11 no presentan a todas las antocianinas esperadas (Tabla 10), debido probablemente a su degradación. Las causas de tal degradación pueden ser diferentes es decir, se podría atribuir a la edad del vino o bien, a condiciones deficientes de almacenamiento, lo que se pudo comprobar con el análisis espectrofotométrico aplicado a todas las muestras. Los resultados de éste análisis se describen en la siguiente sección.

Finalmente, las muestras 7, 9, 12, 15 y 16 presentaron un perfil diferente, con una señal de gran concentración, que hace suponer la posible adición de colorantes artificiales, por lo que se practicó la prueba de Arata que es específica para comprobar tal adición.

Tabla 10. Porcentaje relativo del contenido de antocianinas en cada muestra.

	Dp	Cy	Pt	Pn	Mv	30' Mv- ace-gl	35' Mv- caf-gl	40' Mv- cum-gl	27'	A.A.I.	A.P.D	S.Total	Color	Año de cosecha
Enocianina 1	16.3	5.07	16.43	7.63	35.88	1.3	2.5	4.69		90		90	Morado	
Enocianina 2	4.47	1.18	5.86	1.83	11.10	5.85	8.35	6.8		46.4		46.4	Morado	
Mosto 2	3.30	11.04	2.25	1.8	18.77	8.95	3.9	3.69		51.7		51.7	café-rojo	Sep. 1994
Ext uva	4.24	12.57	3.14	35.5	9.79		8.17	5.26		78.67		78.67	Rojo caraza	1995
1	4.91	2.25	3.24	3.28	8.53	3.13	3.84	1.84		32.02		32.02	café-naranja	1989
2	4.61	2.68	4.57	2.5	19.16	6.52	4.71	3.18		49.91		49.91	café-rojo	1992
3		2.37	2.02	4.45	20.17	0.86	3.12	5.39		38.5		38.5	café-naranja	1992
4	3.14	2.25	1.82	1.58	24.83	19.64	9.88	3.42		86.36		86.36	rojo	1988
5	5.33	1.69	6.75	5.14	22.36	1.43	3.60	0.99		47.51		47.51	rojo	1992
6	1.85	1.46	4.12	1.96	18.07	4.65	5.08	3.69		40.9		40.9	rojo	1992
7	0.69	0.45	1.04	0.30	11.53	2.89	3.69	4.58	33.80	25.36	33.90	59.27	rojo	1993
8	4.16	1.73	3.75	2.04	18.4	5.89	4.07	8.59		44.43		44.43	rojo	1992
9							2.08	1.91	52.7	3.97	52.7	56.67	café-naranja	6 años de c.
10	3.36			1.86	5.33	4.22	6.47	2.69		23.93		23.93	café-rojo	1987
11	6.05			1.66	9.16	4.33	4.36	2.46		28.26		28.26	café-naranja	recién comprado
12						0.57	2.27	0.90	40.72	3.74	40.72	44.46	café-naranja	6 años de c.
13	2.40	0.78	2.46	1.97	8.71	5.54	5.28	1.92		29.04		29.04	rojo	recién comprado
14	2.47	1.08	5.07	1.64	29.11	12.48	3.41	5.11		60.35		60.35	rojo caraza	recién comprado
15						0.206	4.93		73.77	4.83	73.77	78.60	morado	recién comprado
18	2.93	1.25	2.84	2.91	8.86	2.84	5.23	2.29	42.32	29.26	42.32	71.58	rojo	recién comprado

Monoglucósidos: Dp= delphinidina; Cy= cianidina; Pt= petunidina; Pn= peonidina; Mv= malvidina

30' Mv-ace-gl= malvidin-acetil-glucósido.

35' Mv-caf-gl= malvidin-cafeoil-glucósido.

40' Mv-cum-gl= malvidin-cumaril-glucósido.

A.A.I.= Aporte de antocianinas identificadas, que incluyen a los monoglucósidos y los derivados de malvidina.

A.P.D.= Aporte del pico desconocido (tiempo de retención en 27').

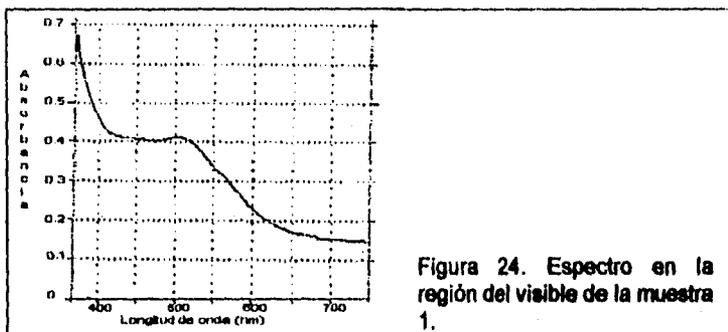
S.Total= suma de A.A.I y A.P.D.

3.3.1 Determinación del Color de los Vinos

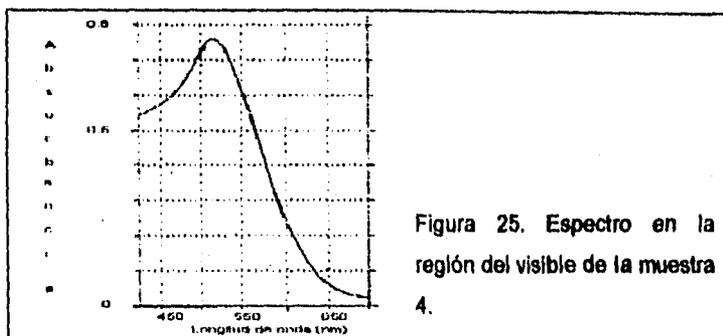
Al hacer una inspección visual del color de las diferentes muestras (Tabla 3) se encontró una marcada diferencia entre las mismas. Siendo las antocianinas los pigmentos responsables del color de los vinos tintos, se esperaría que a mayor cantidad de antocianinas, mayor es la intensidad del color sin embargo, se debe tomar en cuenta la edad del vino, ya que el factor tiempo es sumamente importante. Como se ha explicado en los antecedentes, las antocianinas sufren cambios desde la sulfitación, después en la maduración y finalmente en el almacenamiento. Además de que la forma en que se lleva a cabo la extracción de antocianinas puede variar en la práctica para la elaboración del vino. Este último parámetro se desconoce y no hay manera de suponerlo, por lo que se trabajó con la hipótesis de que todas las muestras analizadas se elaboraron con el mismo método, así como el tratamiento de estabilización fué el mismo para todas las muestras y así poder hacer válida la comparación.

Para cada muestra en estudio se corrió el espectro de absorción en la región del visible y con los datos de cuantificación relativa obtenida por CLAE en pares de iones se trató de establecer una relación entre el contenido de antocianinas y el color del vino.

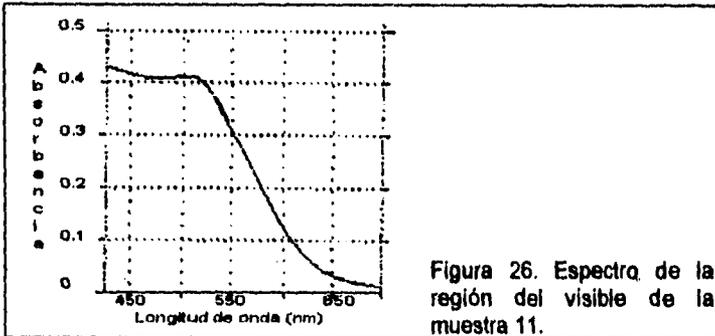
Como se puede observar en la Tabla 10, la muestra 1 tiene 6 años desde que la uva fue cosechada y convertida en vino. El color observado va de acuerdo a su edad y al bajo contenido de antocianinas, lo que es confirmado por su espectro (Figura 24) que comparando con la Figura 5 cae perfectamente dentro de la clasificación de vinos entre 1 y 10 años, pues la curva se torna en forma de hombro en lugar del máximo bien definido.



La muestra 4 si tiene perfectamente bien definido su máximo en 520nm (Figura 25) que concuerda con el color de la muestra y el alto contenido de antocianinas. Sin embargo, este vino es un año mas viejo que la muestra 1 (anteriormente expuesta) por lo que la diferencia de color debido a la cantidad de antocianinas en cada caso hace suponer mejores condiciones de almacenamiento en el vino californiano que en la muestra 1.



La muestra 11 tiene un contenido bajo de antocianinas, descrito ya en el análisis por CLAE, que revela un perfil incompleto de antocianinas. Visualmente presenta un color café naranja que va de acuerdo a su espectro (Figura 26) sin embargo, el vino es de compra reciente, lo que descalifica la degradación de antocianinas por la edad del vino. Estos resultados hacen entonces suponer que las condiciones de almacenamiento de este vino fueron malas. Para verificar esta evaluación se puede recurrir a la información que brinda la botella es decir, el vino estaba envasado en vidrio transparente, cerrado con lámina plastificada, y con escasa información en la etiqueta, lo que confirma la evaluación antes hecha.



En las muestras 9, 7, 12, 15 y 16 se observaron resultados muy diferentes de las muestras restantes.

Muestra	Color	Año de cosecha	% Relativo de Antocianinas	% Relativo del pico no identificado
15	morado	recién comprado	78.60	73.77
12	café-naranja	6 años de comprado	44.46	40.72
9	café-naranja	6 años de comprado	56.67	52.70
7	rojo	1993	59.27	33.90
16	rojo	recién comprado	71.58	42.32

En la muestra 15, el alto contenido de antocianinas encontradas por cromatografía de líquidos va de acuerdo al color intenso y brillante del vino, así

como con su edad relativa. Sin embargo, del 78.6% que tiene como suma total de antocianinas, el 73.7% lo aporta la señal con un tiempo de retención de 27.50 min. En el espectro de la región del visible se puede observar el máximo a 520 nm perfectamente definido, pero además un máximo en 627nm, lo que no sucede en las demás muestras analizadas (Figura 27).

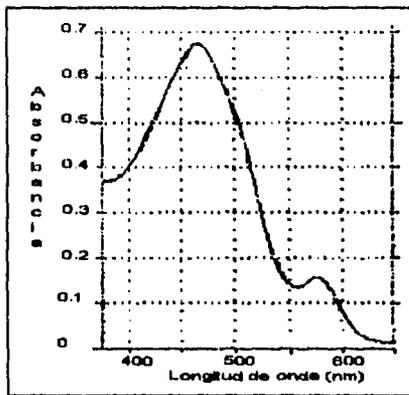


Figura 27. Espectro de absorción de muestra 15.

Las muestras 9 y 12 tienen características similares de color (café-naranja) que va de acuerdo a la edad aproximada de su elaboración. Sin embargo el contenido de antocianinas no es tan bajo, lo que podría indicar buenas condiciones de almacenamiento. Pero al igual que en el caso de la muestra 15, el aporte de una sola señal ($t_r = 27.54$ min) es del 52% en la muestra 9 y 40% en la muestra 12 y en ambos casos la contribución de las demás antocianinas es del 4% aproximadamente.

Finalmente, en las muestras 7 y 16 se observa un color rojo brillante que concuerda con la edad del vino y el relativamente alto contenido de antocianinas. El espectro de absorción muestra el máximo a 520nm muy bien definido justificando el color observado. Sin embargo, la contribución del pico no

identificado aporta el 33.9% en la muestra 7 y el 42.3% en la muestra 16 de las antocianinas totales, pero a diferencia de los casos anteriores, el aporte de las antocianinas restantes es del 25.37% y 29.2% respectivamente.

Se debe remarcar que la relación del color entre el contenido de antocianinas y la edad del vino puede servir para la evaluación de las condiciones de almacenamiento de un vino y servir esto como parámetro de calidad. Sin embargo, para emitir tal juicio es necesario partir de condiciones conocidas y estandarizadas, por ejemplo, poblaciones que hayan tenido el mismo proceso de extracción de antocianinas (termovinificación, fermentación con maceración, vinificación continua, autovinificación, etc.), así como saber el método y tiempo de estabilización (acabado del vino) y si tuvo crianza y cómo, lo que abre otra ruta completa de investigación amplia e interesante.

Es interesante hacer hincapié en que aunque las 5 muestras sospechosas de tener colorante artificial presentan la señal en un tiempo de retención muy parecido, es muy posible que no se trate del mismo colorante, ya que cada muestra tuvo un color diferente.

Por los resultados anteriores se practicó la prueba de Arata, a las muestras 7,9,12,15 y 16 para la determinación de colorantes artificiales en vinos y cuyos resultados se explican en la siguiente sección.

3.3.2 Prueba de Arata

Las muestras 7, 9, 12, 15 y 16 se corrieron junto con un testigo, como se describe en la Tabla 13.

Tabla 13. Distribución de las muestras.

Testigos	Muestras				
	15	12	9	7	16
14	x	x	x	x	x
4				x	x
2				x	x

La elección de testigos fue en base a los resultados obtenidos en los cromatogramas de las muestras con mejor perfil de antocianinas. Se trató de comparar las muestras nacionales con testigo de origen nacional, de igual forma para la muestra importada.

La única muestra de vino que presentó resultados francamente positivos fue la número 15, pues la lana cruda se tiñó de un color rosa mexicano bien perceptible. Las muestras restantes quedaron dudosas, ya que el color adquirido no fue rojo sino diferentes tonos de café. Sin embargo, esto pudo ser debido a que no se adicionó el mismo colorante. Se practicó la prueba también al mosto 1 (por el perfil obtenido) sin embargo también se obtuvo lana de color café.

Conjuntando los resultados de cada muestra, la interpretación es que en las muestras 7, 9, 12 y 16 probablemente fueron adicionadas de algún colorante pero partiendo de uva para su elaboración, ya que las muestras 9 y 12 presentan el perfil esperado de antocianinas además de la señal no identificada (27.5 min). Mientras que en las muestras 9 y 12 se observa en sus espectros que las antocianinas ya fueron degradadas y por eso es que no se observa su presencia en el análisis por cromatografía de líquidos. Finalmente, en la muestra 15 es francamente dudosa su elaboración a partir de uva, sugiriendo por los resultados que es una mezcla artificial de los componentes del vino.

4. CONCLUSIONES

1. De acuerdo a los resultados del análisis por CLAE por pares de iones de las fracciones obtenidas por Extracción en Fase Sólida se puede concluir que este método no es adecuado para la separación individual de cada antocianina. Sin embargo es un tratamiento preliminar que puede eliminar azúcares y ácidos y permite concentrar a las antocianinas utilizando acetonitrilo como eluyente.
2. En la determinación de antocianinas por CGC-AT el derivado silanizado formado con HMDS/TMCS (reportado por Bombardelli) presentó problemas de estabilidad por lo que se sugiere el cambio de reactivos silanizantes, siendo una alternativa formarlo con trimetilsilil imidazol.
3. No se logró reproducir la reacción de hidrólisis de antocianinas por lo que se sugiere la optimización de condiciones para llevar a cabo ésta reacción. Sería recomendable dejar más tiempo la reacción para asegurar el rompimiento de la molécula, que sumado a un derivado más estable (como se mencionó en el inciso anterior) se deben mejorar los resultados.
4. No fue posible realizar el análisis de antocianinas por CG/EM por contar con un detector másico que no detecta adecuadamente valores arriba de 600 m/z, pero teniendo los estándares o un equipo de mayor resolución de masas es factible obtener resultados confiables.
5. La columna utilizada para el análisis de antocianinas por CLAE en fase inversa fue la misma que por CLAE por pares de iones, lo que sugiere que al introducir el contra-ion y aumentar el pH se estabilizó la columna, obteniendo buenos resultados, lo cual no fue posible con fase inversa.
6. Se obtiene una buena resolución y repetibilidad en el análisis de antocianinas con la metodología establecida en CLAE por pares de iones.
7. El orden de elución de las antocianinas monoglucósido por CLAE por pares de iones es el mismo que el reportado en la literatura para CLAE en fase inversa: delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina.

8. Las muestras 1 al 6, 8, 13, 14 y mosto 2 presentaron el perfil característico de *Vitis vinifera*, aunque para asegurar que no contiene antocianinas diglucósido (o verificar en qué concentración) se necesita de los estándares y más aun si es que se pretende que este parámetro se proponga en la NOM para vinos tintos.
9. El perfil de mosto 1 sugiere una composición diferente de todas las muestras analizadas presentando una sola señal de gran concentración. De acuerdo al perfil cromatográfico conocido, esta señal no podía ser debida a antocianinas, por lo que sugirió la adición de colorante artificial al vino. Sin embargo la prueba de Arata para colorantes artificiales dió negativa.
10. En la muestra 15 pudo comprobarse la adición de colorante artificial, mientras las muestras 7, 9, 12 y 16 tuvieron resultados dudosos de la prueba de Arata, aunque pudo ser debido al uso de otro tipo de compuesto.
11. El método propuesto permite el análisis de antocianinas en vino tinto proporcionando un perfil característico que permite identificar y distinguir a las antocianinas más comunes y diferenciar por medio de éste a diferentes cepas.
12. El perfil cromatográfico mostró ser útil en la comparación de los perfiles de Cabernet Sauvignon, por lo que formando una "biblioteca" de perfiles de cepas certificadas se podría utilizar en la determinación de autenticidad de las cepas.
13. El conocimiento del perfil de diferentes frutos ayudará al aislamiento de diferentes antocianinas que podrán ser utilizadas como estándares.
14. Sería interesante hacer una evaluación sensorial conjunta de los vinos tintos, ya que la muestra 15 tenía un color, sabor y aroma diferente al resto de las muestras, sugiriendo una mezcla artificial de los componentes del vino.
15. Con el estudio por CLAE por pares de lones y UV-Visible se pudo determinar si la edad del vino (el año de la cosecha declarado o aproximado) iba de acuerdo a su contenido de antocianinas así como evaluar por medio de estos resultados la calidad del almacenamiento del vino.

ANEXO 1

Chapter 1- Food and Drug Administration (65)

§ 73.170 Grape Skin Extract (Enocianina)

1. **Identidad:** El aditivo Grape skin extract (Enocianina) es un líquido púrpura-rojo preparado de la extracción acuosa de la torta dessemillada remanente después de su prensado, para producir jugo o vino. Contiene los componentes comunes del jugo de uva, nombrados como antocianinas, ácido tartárico, taninos, azúcares, minerales, etc. pero no en las mismas proporciones que se encuentran en el jugo. Durante el proceso, se adiciona dióxido de azufre y muchos de los azúcares extraídos se fermentan para producir alcohol. El extracto es concentrado por evaporación con vacío, durante el cual el alcohol es removido por completo. Una pequeña cantidad de dióxido de azufre puede estar presente.

Tipicamente, grape skin extract tiene una gravedad específica de 1.13 g/ml a 20°C, un contenido de sólidos de 28-32 °Brix (+/- 3°), a pH de 3 la fuerza del colorante es cerca del 1.25% (medido a 520 nm en buffer de citratos a pH de 3.0). Grape skin extract se encuentra disponible deshidratado, teniendo un poder de color de 3 a 4 veces mayor que el del líquido.

2. **Mezclas del colorante para uso alimentario con grape skin extract (Enocianina)** puede contener solo los componentes antes listados como seguros y convenientes como aditivos de color.

Especificaciones. Grape skin extract tiene las siguientes especificaciones:

Residuos de pesticidas: no mayor que lo permitido en o para uvas en la reglamentación promulgada en la sección 408 de FDA.

Plomo (como Pb): no más de 10 ppm

Arsénico (como As): no más de 1 ppm

Usos y restricciones: Grape skin extract puede ser usado sin peligro como colorante, sin embargo en bebidas carbonatadas y base de bebidas, y bebidas alcohólicas están sujetas a las siguientes restricciones:

1. No puede ser usado para colorante de alimentos para los cuales los estándares de identidad hayan sido promulgados en la sección 401 del actual a menos que sea autorizado como colorante.

2. El uso en bebidas alcohólicas a menos que esté de acuerdo con lo interino de las partes 4 y 5 del título 27 CFR.

Requerimientos de etiquetado. La etiqueta de colorante y de las mezcla hechas con él solo o en parte con propósitos de colorear estan conformados en la sección §70.25 de este capitulo. El nombre usual de este aditivo es *grape skin extract* seguido, si se desea, de Enocianina.

Excepción de certificación: La certificación de este aditivo de color no es necesaria para la protección de la salud pública, por lo que queda exento de la certificación requisitada en la sección 706(c) del actual.

Clasificación por la Comunidad Europea (EC) Colorantes permitidos (66)

E163 Antocianos (Schulz 1384 y 1400)

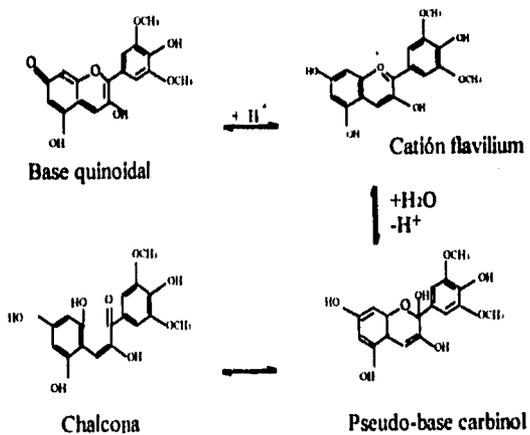
Origen. Pigmentos naturales de plantas -E163(a) Cianidina (rojo); E163(b) Delfinidina (azul); E163(c) Malvidina (morado); E163(d) Pelargoidina (marrón rojizo); E163(e) Peonidina (rojo oscuro); E163(f) Petunidina (rojo oscuro). Todos estos pigmentos están presentes en la savia de las células de muchas flores, frutos tallos y hojas.

Función. Colorante para alimentos

Efectos adversos. No se conoce ninguno

ANEXO 2

Estas formas estructurales son Interconvertibles de acuerdo al siguiente esquema



Composición media de la uva tinta (16).

Componente	Porcentaje
Pulpa	83-83.5
agua	78
azúcares	20
ácidos orgánicos	1.5
ácidos libres	0.25
minerales	0.20
materia colorante	0.05
Pepitas	3.5-4.0
agua	27-39
leñoso	45-48
grasas	4-10
ác. volátiles	0.5-1
materia resinosa	1.3-2
Hollejo	8-9.5
agua	64-78
leñoso	20-32
tanino	0.15-4.23
ác. libres	1-1.3
minerales	1-2
materia colorante	
bitartrato de k	0-1
Raspón	3.5-5

Composición del zumo fresco de uva (16,20)

Componente	Porcentaje
<i>Agua</i>	70 - 85
<i>Hidratos de Carbono</i>	15 - 25
glucosa	8 - 13
fructuosa	7 - 12
pentosas	0.08 - 0.2
pectina	0.01 - 0.1
inositol	0.02 - 0.08
<i>Acidos Orgánicos</i>	0.3 - 1.5
tartárico	0.2 - 1
málico	0.1 - 0.8
cítrico	0.01 - 0.05
<i>Taninos</i>	0.01 - 0.10
<i>Antocianinas</i>	0.04-0.5 *
<i>Compuestos nitrogenados</i>	0.03 - 0.17
proteína	0.001 - 0.01
amina	0.017 - 0.11
humina	0.001 - 0.002
amida	0.001 - 0.004
amoníaco	0.001 - 0.012
residuos	0.01 - 0.02
<i>Compuestos minerales</i>	0.3 - 0.5
aluminio	T - 0.003
boro	T - 0.007
calcio	0.004 - 0.025
cloruros	0.001 - 0.010
cobre	T - 0.0003
hierro	T - 0.003
magnesio	0.01 - 0.025
manganeso	T - 0.0051
potasio	0.15 - 0.25
fosfato	0.02 - 0.05
rubidio	T - 0.001
ác. salicílico	0.0002 - 0.005
sodio	T - 0.020
sulfatos	0.03 - 0.035

T= trazas

6. BIBLIOGRAFIA

1. García Garibay M., López Munguía A. "Biotecnología Alimentaria", Editorial Limusa, México, 1993.
2. "Breves antecedentes históricos de la vid y el vino en México". México vitivinícola, mayo-junio 1973. Organo de difusión de la Asociación Nacional de Vitivinicultores.
3. Guzmán Peredo M. "La mejoría de los vinos Mexicanos" Excelsior, 12 Abril de 1993.
4. Guzmán Peredo M., "Los vinos mexicanos" El Financiero, 26 de Dic. de 1993.
5. Pascal Ribéreau-Gayon, "The Chemistry of Red Wine Color" Institut D'Oenologie, Université de Bordeaux II, France 1974. American Chemical Society.
6. Vogt J., Lempert W. "El vino. Obtención, elaboración y análisis", Editorial Acribia. España, 1986.
7. Harborne J.B. "Methods in Plant Biochemistry", Academic Press, London 1989.
8. Harborne J.B. "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments", Academic Press, London, 1976.
9. Middleton E., Kandaswami Ch. "The impact of the plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer", Edited by J.B. Harborne, Chapman & Hall, London 1993.
10. Cruz Reynei J. "Biosíntesis de antocianinas en plantas", Tesis, Fac. de Química, 1980.
11. Strack, D., Wray, V. "The Flavonoids: Advances in research since 1986", Edited by J.B. Harborne, Great Britain 1994.
12. Lee H. S., Hong V. *J. Chromatogr.* 1992, **624**, 221-234.
13. Golfon J., Brun M., Bourrier M. *J Chromatogr.* 1991, **537**, 101-121.
14. Norma Oficial Mexicana NOM-V-12-1986. SECOFI.
15. Mareca Cortés I. "Enología. Enfoques científicos y tecnológicos sobre la vid y el vino", Editorial Alhambra, España, 1982.
16. Noguera Pujol J. "Enotecnia Industrial" Ediciones Ditagro, Lerida 1973.

17. Branas, J. "La Viticultura Moderna". Simposio Internacional de Viticultura. Comisión Nacional de Fruticultura. México, 1974.
18. González-San José M.L., Santa-María G., Díez C. *J. Food Compos. Anal.* 1990, **3**, 54-66.
19. Ribéreau-Gayon "Anthocyanins as Food Colors" Edited by Pericles Markakis, Academic Press, U.S.A. 1982.
20. Amerine M.A., Ough, C. "Methods for analysis of must and wines", John Wiley & Sons. U.S.A. 1980.
21. Tullio de Rosa "Tecnología del vino tinto". Ediciones Mundi - Prensa. Zaragoza, 1988.
22. Zoecklein B., Fugelsang K., "Production Wine Analysis", AVI Book published U.S.A. 1990.
23. Gómez Cordovés C., González-San M. *J. Agric. Food Chem.*, 1995, **43-3**, 557-561.
24. Larrea Redondo "Enología básica", Editorial AEDOS-Barcelona, 1983.
25. Fernández-López J., Hidalgo V., Almela L., López-Roca J. *J. Sci. Food Agric.*, 1992, **58**, 153-155.
26. Meyen M., Merida J. Medina M *Am. J. Enol. Vitic.*, 1994, **45-2**, 161-166.
27. Wulf W., Nagel Ch. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1978, **29-1**, 42-49.
28. Lamuela R., Raventos, Waterhouse A. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1994, **45-1**, 1-5.
29. Sims C., Bates R. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1994, **45-1**, 56-62.
30. Gao L., Mazza G. *J. Agric. Food Chem*, 1994, **42**, 118-125.
31. Bakker J., Timberlake C. *J. Sci. Food Agric*, 1985, **36**, 1315-1324.
32. Hong V., Wrosta R. *J. Agric. Food Chem*, 1990, **38**, 698-708.
33. Hong V., Wrosta R. *J. Agric. Food Chem*, 1990, **38**, 708-715.
34. Kenjiro Toki, Norio Saito, Kazuro Kawano *Phytochemistry* 1994, **36-3**, 609-612.
35. Kosaku Takeda*, Jeffrey B. Harborne *Phytochemistry* 1986, **25-6**, 1337-1342.

36. Norihiko Terahara, Masa-Atsu Yamaguchi, Kosaku Takeda* *Phytochemistry* 1986, **25-7**, 1715-1717.
37. Kosaku Takeda, Syuji Sato, Hiromitsu Kobayashi *Phytochemistry* 1994, **36-3**, 613-616.
38. Jong-Hwa-kim, Gen-Ichiro Nonaka *Phytochemistry* 1989, **28-5**, 1503-1506.
39. Davies A.J., Mazza G. *J.Agric.Food Chem.* 1992, **40**, 1341-1345.
40. Tingsen Lu, Norio Saito, *Masato Yokoi *Phytochemistry* 1991,**30-7**, 2387-2390.
41. Brønnum-Hansen* K., Honoré Hansen S. *J. of Chromatography*, 1983, **282**, 385-392.
42. Oszmianski J., Sapis J. *J. of Food Science* 1988, **53-4**, 1241-1242.
43. Wilkinson J., Sweeny G., Iacobucci A. *J. of Chromatography*, 1977, **132**, 349-351.
44. Mazza G., Gao L. *Phytochemistry* 1994, **35-1**, 237-239.
45. Kärppä J., Kallio H., Peltonen Y. *J. Food Science* 1984, **49**, 634-636.
46. Francis F.J. *J. of Food Science* 1985, **50**, 1640-1642.
47. Hale M., Francis , Fagerson I. *J. of Food Science* 1986, **51-6**,1511-1513.
48. Camire A., Clydesdale F. *J. Food Sci* 1979, **44**, 926-927.
49. Amitabh Ch., Muraleedharan G. N., Amy Iezzoni L. *J. Agric. Food Chem.* 1992,**40**, 967-969.
50. McDowall R., *J. of Chromatography*, 1989, **492**,3-58.
51. Somers C., Evans M. *J.Sci.FoodAgric.* 1977, **28**, 279-287.
52. Skoog D., Leary J. "Análisis Instrumental", McGraw-Hill, España 1994.
53. Hradzina G., Franzese A. *Phytochemistry*, 1974, **13**, 225-229.
54. Strobel H., Heineman W.R. "Chemical Instrumentation: A Systematic Approach" Third Edition. John Wiley & Sons, U.S.A 1988.
55. Clement R. *Gas Chromatography*. Vol 111. John Wiley & Sons. U.S.A. 1990.
56. Baj A., Bombardelli E., Gabeta B. *J. of Chromatography*, 1983, **219**, 365-272.

57. Bombardelli E., Bonati A., Gabeta B., Martinelli E., Mustich G. *J. of Chromatography*, 1977, **139**,111-120.
58. Mc Nair H., Bonelli E. "Basic Gas Chromatography" Varian, U.S.A 1969.
59. Wing-On Kwan, Kowalski B. *J. Agric. Food Chem*, 1980, **28**, 356-359.
60. Etièvant, Schlich *J.Sci. Food Agric*. 1988, **42**, 39-54.
61. Drdák M., Daucík P., Kubasky J. *J. of chromatography*, 1990, **504**, 207-209.
62. Williams M., Hradzina G., Wilkinson J., Sweeny G., Iacobucci A. *J. of Chromatography* 1978, 155, 389-398.
63. Snyder LI., Glajch J. "Practical HPLC method development" John Wiley & Sons, U.S.A. 1988.
64. Symons P. "Anthocyanidin and Flavonoid compound: a challenge for HPLC methods" Eurofins Laboratories 2nd European Symposium, France 1993.
65. Code of Federal Regulations. Food & Drugs. April,1984. Parts 1 to 99.
66. Marmion Daniel, "Handbook of U.S. Colorants. Foods, Drugs, Cosmetics and Medical Devices", Third edition. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A. 1991.
67. Control Físico-Químico de alimentos diversos. Métodos Generales. Secretaría de Salud, México D.F. 1990.
68. DeJong D., Radford T. *J. of American Chemical Society* 1967, 91:7,1728-1740.