

Este manual ha sido elaborado como una herramienta de apoyo al trabajo de los técnicos y productores, responsables directos de la calidad de la uva y el vino. Con tal fin, se han detallado las técnicas de análisis que pueden ser utilizadas para caracterizar las uvas. Se identifica el método de análisis, con el detalle de materiales, reactivos, preparación de soluciones, procedimientos y precauciones de manipulación. El manual ha sido diseñado para una fácil comprensión, de modo que sea posible aplicar las técnicas en bodegas y laboratorios de mediana complejidad. Los métodos que incluye pueden abordarse con la complejidad metodológica y los aparatos de análisis generalmente disponibles.

La redacción de este Manual de Técnicas Analíticas para la Evaluación de Compuestos Fenólicos y Otros Componentes de la Uva, surgió durante la investigación que realizó un grupo de instituciones relacionadas a la vitivinicultura argentina, con el objeto de establecer estándares objetivos de calidad de uvas. Estándares que aporten mayor previsibilidad y transparencia a las relaciones que se establecen en la cadena de valor vitivinícola. Para esto, los autores, investigadores de la cátedra de Enología I de la FCA-UNCuyo y de la Estación Experimental Agropecuaria Mendoza INTA, recopilaron los protocolos de los análisis físicos y químicos que utilizaban en sus laboratorios.

La publicación del manual se inscribe en el proyecto Desarrollo de Sistemas de Manejo del Viñedo para Optimizar la Calidad y Producción de Uvas de Vinificar y Creación de Estándares de Calidad de Uva. Es un proyecto ejecutado por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo y los Consorcios Regionales de Experimentación Agrícola (CREA), con financiación de la Corporación Vitivinícola Argentina (COVIAR).

ISBN: 978-987-1623-42-6



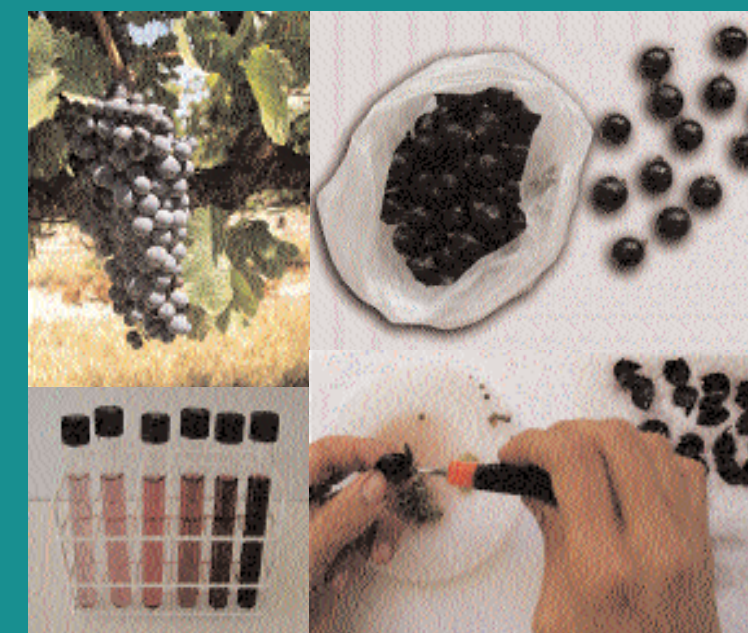
Manual de técnicas analíticas para la evaluación de compuestos fenólicos y otros componentes de la uva

Hernán F. Vila / Silvia C. Paladino / Jorge J. B. Nazrala / Claudia C. Lucero

# Manual de técnicas analíticas para la evaluación de compuestos fenólicos y otros componentes de la uva

Hernán F. Vila / Silvia C. Paladino  
Jorge J. B. Nazrala / Claudia C. Lucero

Colaboran: INTA - Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo - AACREA - COVIAR



Centro Regional Mendoza - San Juan  
<http://www.inta.gov.ar/region/mesa/index.htm>

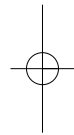


Ediciones  
Instituto Nacional de  
Tecnología Agropecuaria

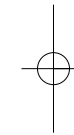
Publicaciones  
Regionales



MANUAL DE TÉCNICAS  
ANALÍTICAS PARA LA EVALUACIÓN  
DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y  
OTROS COMPONENTES DE LA UVA



Hernán F. Vila  
Silvia C. Paladino  
Jorge J. B. Nazrala  
Claudia C. Lucero



Diciembre 2009  
Mendoza - Argentina

MANUAL DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA EVALUACIÓN DE COMPUESTOS  
FENÓLICOS Y OTROS COMPONENTES DE LA UVA

Autores: Hernán F. Vila, Silvia C. Paladino, Jorge J. B. Nazrala, Claudia C. Lucero

Diseño interior: Inca Editorial

Colaboran:

INTA - Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo - AACREA - COVIAR

Manual de técnicas analíticas para la evaluación de compuestos  
fenólicos y otros componentes de la uva / Hernán Vila ... [et.al.]. -  
1a ed. - Luján de Cuyo : Ediciones INTA, 2009.  
88 p. : il. ; 28x20 cm.

ISBN 978-987-1623-42-6

1. Uva. 2. Compuestos Fenólicos. 3. Técnicas Analíticas. I. Vila, Hernán  
CDD 634.8

Fecha de catalogación: 09/12/2009

Reservados todos los derechos. Queda rigurosamente prohibida, sin la autorización escrita de la autora, bajo las sanciones establecidas en las leyes, la reproducción parcial o total de esta obra por cualquier medio o procedimiento, incluidos la reprografía y el tratamiento informático.

Copyright © 2009

**EDICIONES INTA**

**Centro Regional Mendoza-San Juan**

Acceso Sur y Aráoz s/n, Luján de Cuyo

CP 5507 Mendoza

<http://www.inta.gov.ar/region/mesa/index.htm>

Tirada 500 ejemplares

Primera Edición

Impreso en Argentina - Printed in Argentina

ISBN 978-987-1623-42-6

Queda hecho el depósito que marca la Ley 11.723

Mendoza, República Argentina

## Los autores

**Hernán F. Vila:** ingeniero agrónomo, magister scientiae en viticultura y enología, investigador del Laboratorio de Viticultura de la EEA INTA Mendoza, Argentina.

**Silvia C. Paladino:** ingeniera agrónoma, magister scientiae en tecnología de alimentos, docente e investigadora de la Cátedra de Enología I, Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo, Argentina.

**Jorge J. B. Nazrala:** ingeniero agrónomo, magister scientiae en viticultura y enología, profesor titular e investigador de la Cátedra de Enología I, Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo, Argentina.

**Claudia C. Lucero:** ingeniera agrónoma, investigadora del Laboratorio de Viticultura de la EEA INTA Mendoza, Argentina.

## Tabla de contenidos

	Página
<b>PREFACIO</b> .....	5
<b>SECCIÓN 1: COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA UVA</b>	
1.1. Introducción .....	6
1.2. Los taninos y antocianos en la estructura celular de la baya .....	15
1.3. Extracción de antocianos y taninos durante la maceración .....	16
1.4. Reactividad química de los taninos y antocianos de la uva .....	19
<b>SECCIÓN 2: TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA EVALUACIÓN DE UVA</b>	
2.1. Muestreo de uva a campo y conservación de la muestra .....	28
2.2. Determinación de clase modal, diámetro y peso promedio del grano .....	31
2.3. Método alternativo para determinación de peso, volumen y diámetro promedio de bayas con probeta .....	34
2.4. Determinación de las relaciones hollejo/baya y semilla/baya .....	36
2.5. Contenido de azúcar por medios físicos, refractómetro, densímetro o aerómetro.	37
2.6. Medición de pH .....	42
2.7. Acidez total titulable .....	44
2.8. Antocianos totales en hollejos por el Método Riou Asselin .....	46
2.9. Polifenoles totales en hollejos por el Método Riou Asselin .....	49
2.10. Antocianos totales en muestras de uva (hollejo y semilla) por el Método Glories .	51
2.11. Polifenoles totales en muestras de uva (hollejo y semilla) por el Método Glories .	57
2.12. Extracción de compuestos fenólicos para determinación de taninos y catequinas en hollejos y de taninos, catequinas y fenoles totales en semillas .....	58
2.13. Taninos condensados o proantocianidinas. Método del butanol ácido (en hollejos y semillas) .....	62
2.14. Catequinas o flavan-3-oles monómeros (en hollejos y semillas) .....	68
2.15. Polifenoles totales en semillas .....	73
2.16. Degustación de bayas para monitorear maduración .....	74
<b>ABREVIATURAS O SÍMBOLOS UTILIZADOS</b> .....	82
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	83

## PREFACIO

La redacción de este Manual de Técnicas Analíticas para Evaluación de uvas surgió durante el estudio que un grupo de Instituciones relacionadas con la Vitivinicultura Argentina, realizaron con el objeto de establecer estándares objetivos de calidad de uvas. Estas instituciones, la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo (FCA-UNCuyo), la Estación Experimental Agropecuaria Mendoza del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA Mendoza. INTA) y la Asociación Argentina de Consorcios de Experimentación Agrícola (AACREA), advirtieron la necesidad de contar con estos estándares como un medio para dar mayor previsibilidad y transparencia a las relaciones que se establecen en la Cadena de Valor. Con estos fines convergieron en un proyecto, que luego fue auspiciado y financiado por la Corporación Vitivinícola Argentina (COVIAR), entidad encargada de coordinar el plan estratégico Argentina Vitivinícola 2020.

Durante el desarrollo de los estudios relativos a la creación de los estándares, surgió la necesidad de brindar una herramienta de apoyo al trabajo de los técnicos y productores, responsables primarios en la calidad del vino. Con este fin, los investigadores de la EEA Mendoza del INTA y de la FCA-UNCuyo han detallado las técnicas de análisis que pueden ser utilizadas para la caracterización de muestras de uva.

Este trabajo se ha diagramado en dos secciones. En la sección 1 se exponen, en forma teórica, los conceptos relativos a la composición fenólica de la uva, la ubicación de estos compuestos dentro del grano de uva, los fenómenos de extracción durante la vinificación y las reacciones químicas vinculadas a estas moléculas. En la sección 2 se desarrollan las distintas técnicas analíticas para evaluar la calidad de las uvas. Se incluyen los distintos métodos de análisis, los materiales y reactivos necesarios, la preparación de soluciones, los procedimientos de medición y las precauciones de manipulación.

El manual está destinado a técnicos agrónomos, enólogos y químicos para su uso en bodegas o laboratorios de mediana complejidad; los métodos que incluye son los que pueden abordarse con los aparatos de análisis generalmente disponibles. En cada análisis se incluyen las citas bibliográficas que indican el desarrollo original.

Es importante destacar que el largo proceso de elaboración y revisión que encararon los autores fue guiado por la convicción de que **“la búsqueda de una vida más humana, debe comenzar por la educación”** (Ernesto Sábato).

Los Autores, noviembre de 2009.

## SECCIÓN 1: COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA UVA

### 1.1 INTRODUCCIÓN

Las sustancias fenólicas se encuentran entre los constituyentes fundamentales de las uvas tintas. En los vinos tintos determinan importantes características organolépticas, relacionadas con el color y el gusto. Dentro de los fenoles, los antocianos son responsables esenciales del color rojo, mientras los taninos se asocian con sensaciones bucales, unas veces agradables (estructura, concentración) y otras desagradables (amargo, aspereza, sequedad, astringencia).

Las sustancias fenólicas provienen de la uva y son extraídas durante la fase de vinificación conocida como maceración, que involucra los fenómenos de difusión y de disolución. La extracción y manejo de los antocianos y taninos en los vinos, es vital para determinar la calidad y el estilo del vino tinto. Lamentablemente, los factores que favorecen la difusión y la disolución, como un mayor contacto entre las fases líquida y sólida o un aumento del tiempo de maceración, incrementan la cesión de todo tipo de compuestos (agradables y desagradables).

Las sustancias cedidas a los vinos en la maceración no siguen un modelo simple, donde se pueda asociar en forma directa la concentración en el vino con los contenidos en la uva y la intensidad de la difusión. Esto se debe a que las sustancias extraídas durante la maceración sufren una serie de fenómenos colaterales, tales como la saturación y la precipitación, la adsorción sobre las partes sólidas, la condensación molecular, la oxidación, la copigmentación y los fenómenos coloidales. Además, muchos de estos fenómenos continúan durante el período de conservación del vino.

Ribéreau Gayon (1982) investigó el efecto del tiempo de maceración sobre el grado de extracción de sustancias fenólicas en los vinos y puso en evidencia que, el contenido de antocianos alcanzaba un máximo en los primeros 5 o 6 días de maceración, pero luego caía paulatinamente. Los taninos, en cambio, crecían constantemente, pero la cesión pasaba por dos etapas, una de cesión rápida - hasta el 5° o 6° día -, correspondiente a taninos hidrosolubles y otra más lenta, correspondiente a taninos solubles en alcohol. Si bien actualmente se conocen los patrones que sigue la extracción, no es posible asegurar cómo afectará al color y a la astringencia del vino, el grado de extracción logrado y los distintos tiempos de maceración. Esto se debe a que muchos fenómenos como la copigmentación de los antocianos y las combinaciones entre los taninos y los polisacáridos, por citar algunos, han sido esclarecidos recién en los últimos años.

Muchas de las reacciones a las que están sujetos los fenoles en los vinos dependen de su composición (variedades químicas y concentraciones), y ésta está fuertemente determinada por la variedad de uva. Así, se sabe que los vinos de Pinot Noir tienen problemas para expresar altos niveles de color debido a la estructura química de sus antocianos. Otras variedades, como Cabernet Sauvignon y Malbec, se comportan de manera opuesta.

En la uva existe una cantidad de compuestos que contienen grupos fenoles altamente reactivos. Estos compuestos pasan luego al vino, donde participan de sus características organolépticas. El grupo fenol básico es un benceno aromático unido a un radical hi-

droxi. La reactividad de estos compuestos es debida tanto a la presencia de la función fenol, que por la movilidad de sus átomos de hidrógeno, presenta un carácter ácido; como al núcleo benzénico que puede sufrir sustituciones electrófilas. Los tipos de moléculas fenólicas en las uvas y vinos pueden ser categorizados en forma amplia en fenoles flavonoides, con un esqueleto de tipo 2-fenil benzopirona, y no flavonoides, que son básicamente ácidos fenólicos. Los fenoles no flavonoides son importantes en la pulpa de la uva y en la madera de roble, mientras los fenoles flavonoides no existen en la pulpa pero son importantes en los hollejos, escobajos y semillas.

A continuación se hace una descripción de los principales fenoles de la uva, de acuerdo con las revisiones realizadas por Parley (1997) y Cheynier *et al.* (1998). En la figura 1.1 se muestran esquemáticamente los distintos grupos químicos que componen los principales fenoles de la uva.

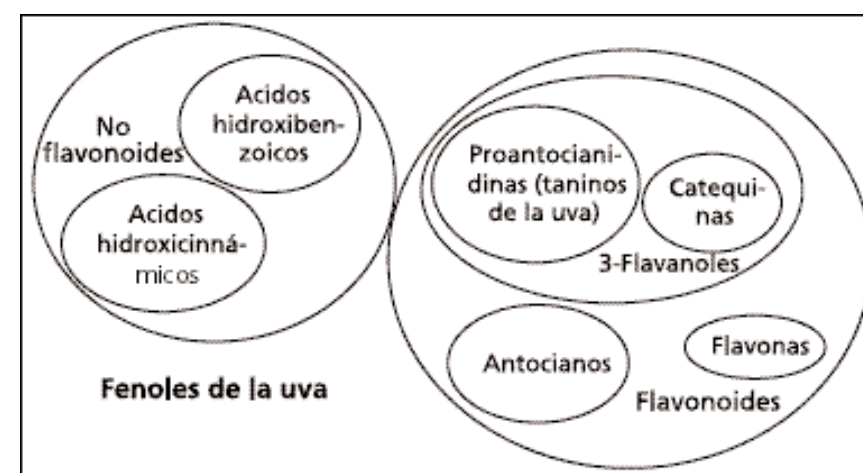


Figura 1.1: Principales fenoles de la uva

### PRINCIPALES FENOLES DE LA UVA:

#### **Fenoles no flavonoides:**

Son básicamente ácidos fenólicos de dos tipos, los ácidos hidroxibenzoicos, formados por un fenol ( $C_6H_5OH$ ; figura 1.2) unido a una función ácida ( $-COOH$ ), y los ácidos hidroxicinnámicos, formados por un fenol que porta una cadena lateral insaturada. Otros derivados no flavonoides son los estilbenos.

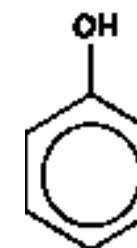


Figura 1.2: Representación de un fenol ( $C_6H_5OH$ )

a) *Ácidos hidroxicinnámicos:* se encuentran en las vacuolas de las células del hollejo y

de la pulpa de la uva bajo la forma de ésteres<sup>1</sup> tartáricos. Los principales son los ésteres de los ácidos cafeico, cumárico y ferúlico (figura 1.3). En las concentraciones encontradas en los vinos no tienen impacto en las características aromáticas.

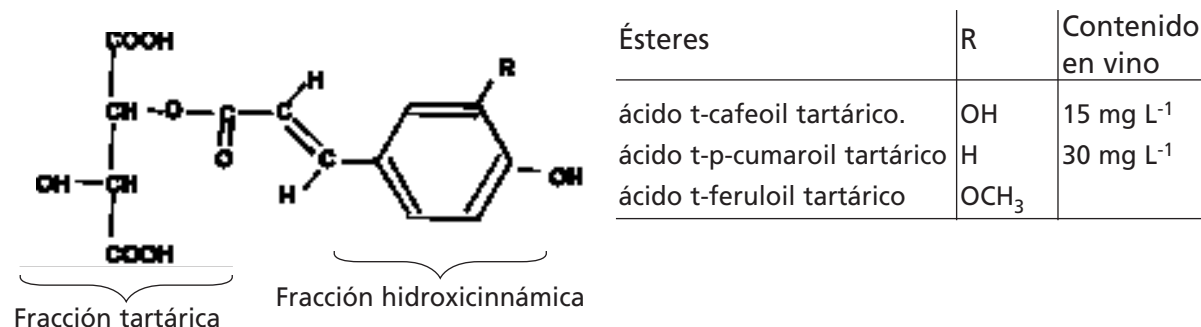


Figura 1.3: Ésteres hidroxicinnámicos de la uva

Las cantidades de ácidos hidroxicinnámicos son altas en mostos escurridos libremente, pues ellos son los principales fenoles de la pulpa. El ácido cafeico y su éster tartárico (caftárico) son los principales sustratos de la oxidación enzimática de los mostos. Sus quinonas tienen una alta reactividad y participan en la oxidación y en el pardeamiento de los antocianos y de los taninos. Una quinona (o benzoquinona) se produce por oxidación de un compuesto fenólico adquiriendo la fórmula de C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (figura 1.4). Generalmente las quinonas son de color amarillo, pardo o rojo ladrillo, tienen propiedades oxidantes lo cual las hace inestables, originando un gran número de productos a partir de ellas.

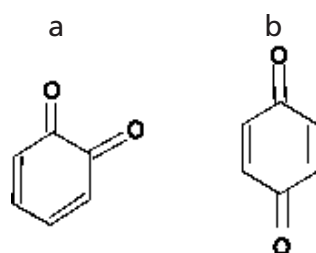


Figura 1.4: α-Benzoquinona (a) y β-Benzoquinona (b), fórmula C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

Los ácidos p-cumárico y caféico se encuentran muchas veces acilando<sup>2</sup> los sustitutos glucósidos de los antocianos. Esto es importante para la estabilidad del color de estos antocianos, pues favorecen la autocopigmentación (Dangles *et al.*, 1993).

b) *Ácidos hidroxibenzoicos*: las semillas de uva contienen ácido gálico libre (figura 1.5) y esterificado con 3-flavonoles. Su contenido en el vino ronda los 10 mg L<sup>-1</sup>. El ácido gálico se oxida muy fácilmente para dar quinonas y peróxido de hidrógeno.

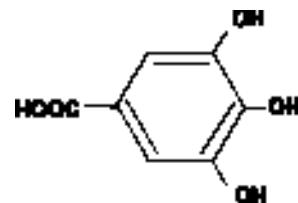


Figura 1.5: Estructura del ácido gálico

<sup>1</sup> Un éster se origina cuando reacciona un ácido carboxílico con un alcohol.

<sup>2</sup> La reacción de acilación es aquella en donde se sustituye el hidrógeno del anillo aromático por un grupo ácido (R-COOH) confiriéndole estabilidad a la molécula.

Otros ácidos hidroxibenzoicos, como el siríngico, el vainílico y el p-hidroxibenzoico, se pueden encontrar en vinos que han estado en contacto con madera de roble. En este caso provienen de la degradación de la lignina. Las concentraciones de ácidos hidroxibenzoicos en el vino, son realmente bajas, sobre todo comparadas con las de los otros fenoles presentes.

**Fenoles flavonoides:**

En los vinos tintos son mucho más importantes los fenoles flavonoides, por la gran cantidad extraída de las semillas y hollejos durante la maceración. Forman una familia de sustancias en la que todas tienen el mismo esqueleto básico de 15 átomos de carbono, de tipo 2-fenil benzopirona (figura 1.6). Son responsables de muchas de las características de los vinos tintos, incluidas el color, muchas sensaciones bucales y las características de envejecimiento. No existen en la pulpa de la uva, pero sí en las semillas, hollejos y escobajos.

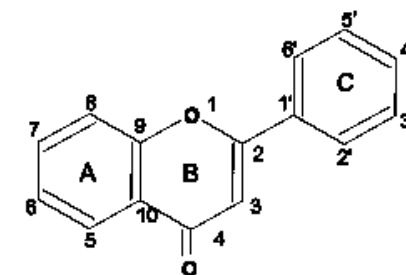
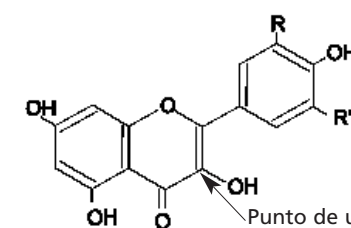


Figura 1.6: Estructura de la 2 fenil benzopirona (los números indican la identificación de cada átomo de carbono)

La familia de los flavonoides está representada en la uva principalmente por flavonoles, antocianos y 3-flavonoles (proantocianidinas o taninos de la uva y catequinas). Se encuentran también otros grupos de menor importancia como los flavononoles y las flavonas.

a) *Flavonoles*:

La figura 1.7 muestra los cuatro principales flavonoles de la uva bajo su forma aglicona (porción no azucarada). Los flavonoides se caracterizan por poseer un enlace insaturado entre el C2 y C3 y otro enlace insaturado unido a un oxígeno en el C4. Los flavonoles están presentes en los hollejos de las uvas blancas y tintas, bajo la forma de glicósidos<sup>4</sup> en la posición 3 (Cheynier *et al.*, 1998); los más comunes en la uva son la quercetina y el kaempferol. Los glicósidos más frecuentes involucran la presencia de glucosa, galactosa y ácido glucurónico (Price *et al.*, 1995a).



Flavonoles	R	R'
kaempferol	H	H
quercetol	OH	H
miricetol	OH	OH
isoramnetol	OCH <sub>3</sub>	H

Figura 1.7: Flavonoles de la uva bajo su forma aglicona

<sup>3</sup> Los glicósidos son sustancias caracterizadas químicamente por estar formadas por un azúcar unido a una porción no azucarada.

Los flavanoles aparecen en los hollejos de las uvas, en los escobajos y en las hojas como una respuesta de la planta al estímulo de la radiación UV de la luz solar (Price *et al.*, 1995a). Los contenidos en flavonoles varían de 10 a 100 mg kg<sup>-1</sup> de bayas. Son fácilmente extractables en la vinificación, aunque no son muy solubles en agua y es preciso que exista cierta cantidad de alcohol como solvente. Son amargos, tienen un poder de copigmentación fuerte y pueden estar involucrados en las reacciones de polimerización de los fenoles (Price *et al.*, 1995b).

#### b) Antocianos:

Los antocianos son pigmentos flavonoides que se encuentran en varios órganos de las plantas (frutos, flores y hojas), confiriéndoles colores rojo, azul y violeta. En la uva, su función principal es la de atraer a los pájaros que actúan como diseminadores de las semillas. Por otro lado, en la planta también cumplen funciones como antioxidantes, fitoalexinas y antibacterianos. En el grano de uva se encuentran en las vacuolas celulares del hollejo de las uvas tintas. También se encuentran en la pulpa de las variedades tintoreras (e.g. Alicante Bouchet). Durante el proceso de maceración, en la vinificación en tinto, pasan al vino, donde son responsables del color rojo. Durante el estacionamiento del vino están involucrados en reacciones de polimerización con otros fenoles. Químicamente, son glucósidos<sup>4</sup> de núcleo flavilium polihidroxilados y/o metoxilados. El núcleo flavilium comprende un anillo A que es un derivado del floroglucinol encadenado a un anillo pirilo, el cual está unido a un anillo fenólico B (figura 1.8). Las formas agliconas (sin molécula de azúcar) que corresponden a la fórmula general que aparece en la figura 1.8, se denominan antocianidinas o antocianidoles (Mazza y Brouillard, 1987) y no se encuentran en forma libre en uvas y vinos pues son muy inestables. Su acumulación puede ser inducida por bajas temperaturas, radiación ultravioleta y ataque de patógenos (Kong *et al.*, 2003). Debido a esta característica actúan como antioxidantes, y previenen o detoxifican procesos que conducen a la generación de radicales libres o muerte celular (Kong *et al.*, 2003). En la planta, también actúan en la protección contra excesos de luz o estrés lumínico (Neill y Gould, 2003).

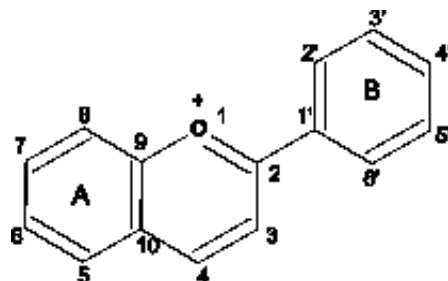
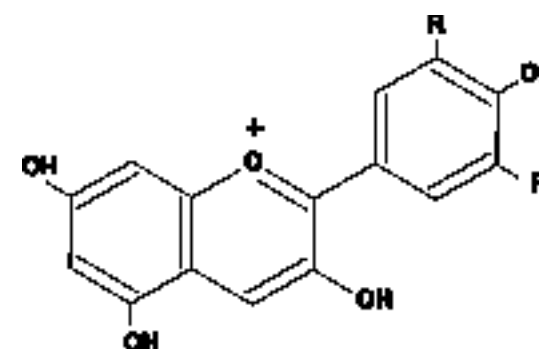


Figura 1.8: Estructura química de las antocianidinas (forma flavilium)

Los antocianos se diferencian por el nivel de hidroxilación y/o de metilación de su anillo B; por la naturaleza, el número y la posición de los azúcares unidos a la molécula; y por el número de los ácidos que esterifican los azúcares (figura 1.9). Las seis antocianidinas más comunes en la uva son: cianidina, delphinidina, pelargonidina, peonidina, malvidina y petunidina (Leguizamón *et al.*, 2005).

<sup>4</sup> Un glucósido o glicósido es una molécula compuesta por un glúcido (generalmente monosacáridos) y un compuesto no glucídico. Las plantas almacenan los productos químicos importantes en forma de glucósidos inactivos; si estos productos químicos son necesarios, se hidrolizan en presencia de agua y una enzima, generando azúcares importantes en el metabolismo de la misma.



Antocianidinas	R	R'
Cianidina	OH	H
peonidina	OCH <sub>3</sub>	H
delfinidina	OH	OH
petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH
malvidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Pelargonidina	H	H

Figura 1.9: Antocianidinas o antocianinas de la uva (Leguizamón *et al.*, 2005)

Las antocianidinas tienen al menos un grupo O-glucosa que les otorga estabilidad (Furtado *et al.*, 1993). Las especies americanas del género *Vitis*, como *Vitis labrusca*, *Vitis riparia*, *Vitis rupestris* y muchos de sus híbridos, contienen 3,5 diglucósidos. En *Vitis vinifera*, la glicosilación sólo se da en la posición 3. El grupo glucosa puede estar acilado con los ácidos acético, p-cumárico y cafeico en uvas tales como Cabernet Sauvignon, aunque otras variedades como Pinot Noir no contienen antocianos acilados (Wulf y Nagel, 1978). También es propia de esta especie la presencia mayoritaria de 3-glucósido de malvidina o sus derivados acilados. En Pinot Noir más del 90% de los antocianos presentes corresponden a este tipo (Dicey, 1996). El contenido de antocianos en la uva y los niveles relativos de las distintas formas, pueden variar de acuerdo con las variedades, las condiciones ecológicas y el manejo del viñedo. En Bordeaux, para Merlot, se citan contenidos de antocianos de 900 a 1500 mg kg uva<sup>-1</sup> (Ribéreau-Gayon, 1982). En los vinos tintos, al fin de la vinificación, se han encontrado antocianos en cantidades que van de 100 a 800 mg L<sup>-1</sup> (Ribéreau-Gayon, 1982). El color y la estabilidad de los antocianos están ligados a la estructura de las moléculas, referida a la cantidad y disposición de los grupos hidroxilo y metoxi en el núcleo B y a la acilación del grupo glucósido. El aumento de la cantidad de hidroxilos en el núcleo B va acompañado de un aumento en la longitud de onda máxima de absorción de la luz, esto es conocido como efecto batocromo. El aumento de los grupos metoxi provoca el mismo fenómeno (figura 1.10).

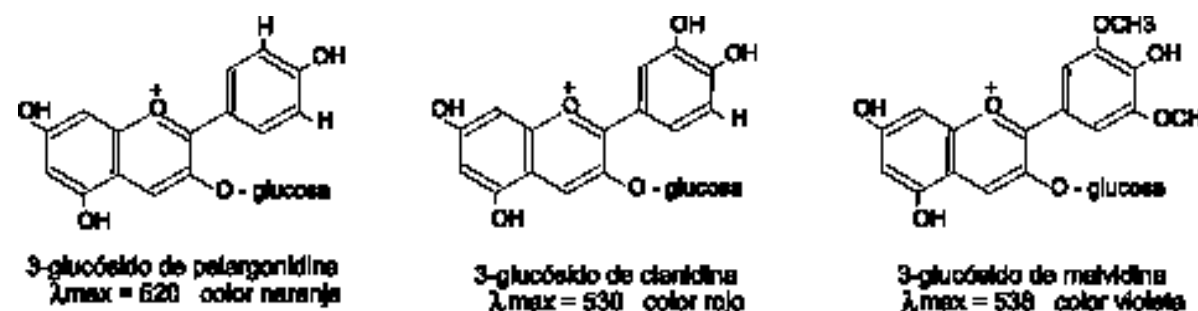


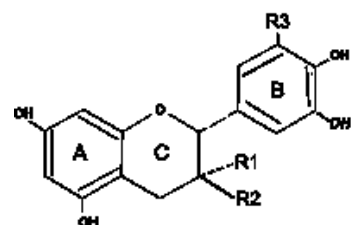
Figura 1.10: Efecto batocromo en los antocianos

La cantidad de grupos hidroxilo y su vecindad en el anillo fenólico, tiene importantes efectos sobre la propensión de la molécula a oxidarse y pardearse (ver oxidación de los polifenoles, capítulo 1.4). La esterificación de los azúcares de la molécula de antocianidina con ácido cafeico o p-cumárico aumenta su estabilidad y su capacidad colorante,

debido a efectos de autocopigmentación. Estos efectos se analizan en detalle en el apartado sobre copigmentación (capítulo 1.4). El color de un vino tinto joven se debe principalmente a los antocianos monoméricos (Somers y Evans, 1977), pero debido a la naturaleza química de los antocianos no existe una relación directa entre la concentración de antocianos y el color (Somers y Evans, 1974). El pH, el contenido de  $\text{SO}_2$ , la polimerización y la copigmentación son factores que afectan la expresión del color. Dentro de estos, la copigmentación está a su vez influenciada por el pH, por la concentración de etanol, por la temperatura y por la cantidad y tipo de otros compuestos que actúan como copigmentos. Cuando el vino madura y envejece, los pigmentos poliméricos son cada vez más responsables del color rojo del vino. Las reacciones de polimerización que involucran a los antocianos están fuertemente influenciadas por la temperatura (Somers y Evans, 1986) y el contacto con el oxígeno (Timberlake y Bridle, 1976; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1983).

### c) 3- Flavanoles: catequinas y proantocianidinas (taninos de la uva):

Este grupo está presente en la uva como monómeros y bajo formas más o menos polimerizadas. Los monómeros se conocen genéricamente como catequinas. Los polímeros constituyen los taninos de la uva, también llamados taninos condensados o proantocianidinas. Los principales 3-flavanoles monómeros de la uva son la (+)- catequina y su isómero la (-)- epicatequina<sup>5</sup>, pudiendo encontrarse este último bajo la forma de éster gálico (3-galato de epicatequina). Las formas galocatequina, epigalocatequina y epigalocatequina galato también existen, aunque en menor cantidad. Todos estos compuestos, tienen un esqueleto común formado por dos anillos benzénicos A y B y un anillo heterocíclico C, sin dobles ligaduras, que contiene oxígeno. En la figura 1.11a y b se presentan las estructuras de estos compuestos.



Monómero	R1	R2	R3
Catequina	H	OH	H
Epicatequina	OH	H	H
Galocatequina	H	OH	OH
Epigalocatequina	OH	H	OH

Figura 1.11a: Estructura de los 3-flavanoles monómeros de la uva

Todos los productos de condensación, a partir de  $n=2$  (dímeros), son considerados como proantocianidinas. Las proantocianidinas son comúnmente denominadas taninos de la uva, término que hace referencia a su capacidad para precipitar las proteínas. El nombre de proantocianidinas se debe a que estas moléculas tienen la propiedad de liberar antocianidinas en medio ácido y caliente, por la ruptura de uniones intermonoméricas. Las proantocianidinas son los flavonoides cuantitativamente más importantes en la uva y el vino, donde inciden sobre los caracteres organolépticos y otorgan propiedades beneficiosas para la salud humana. La astringencia de los vinos tintos se debe principalmente a la presencia de proantocianidinas. Las catequinas son amargas y ligeramente astringentes, pero no se clasifican como taninos pues no precipitan las proteínas (Bate-Smith, 1973; Maury *et al.*, 2001).

<sup>5</sup> La epicatequina difiere de la catequina por la disposición de los carbonos asimétricos C2 y C3. En la epicatequina las posiciones de los hidrógenos unidos a C2 y C3 son arriba-arriba con respecto al plano principal de la molécula. En la catequina son arriba-abajo. En los diagramas de las moléculas esto se ilustra mediante doble línea punteada para arriba-arriba y línea punteada y línea gruesa para arriba-abajo.

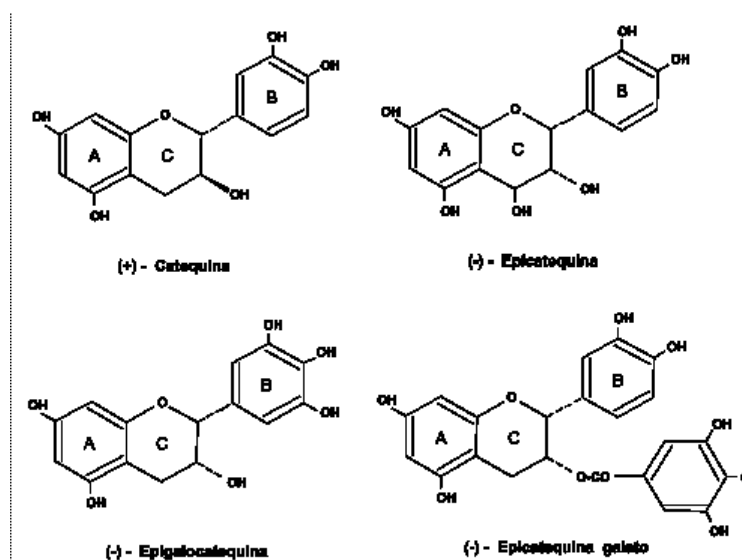


Figura 1.11b: Principales 3-flavanoles monómeros de la uva (Waterhouse *et al.*, 2000)

El esqueleto de los polímeros puede estar constituido por diversas formas monómeras. Teniendo en cuenta estas formas, dos grupos de proantocianidinas están presentes en la uva: las procianidinas (formadas por catequina, epicatequina y epicatequina 3-galato) y las prodelfinidinas (formadas por galocatequina y epigalocatequina, las cuales son isómeros ópticos<sup>6</sup>). Por hidrólisis ácida y en caliente las procianidinas y las prodelfinidinas derivan hacia las antocianidinas del tipo cianidina y delfinidina respectivamente.

Cuando las catequinas se condensan, las unidades monómeras se unen entre sí por uniones covalentes C-C de dos tipos: la unión 4-6, entre el C4 de una unidad y el C6 de la otra unidad y la unión 4-8, entre el C4 de una unidad y en el C8 de la otra (figura 1.12).

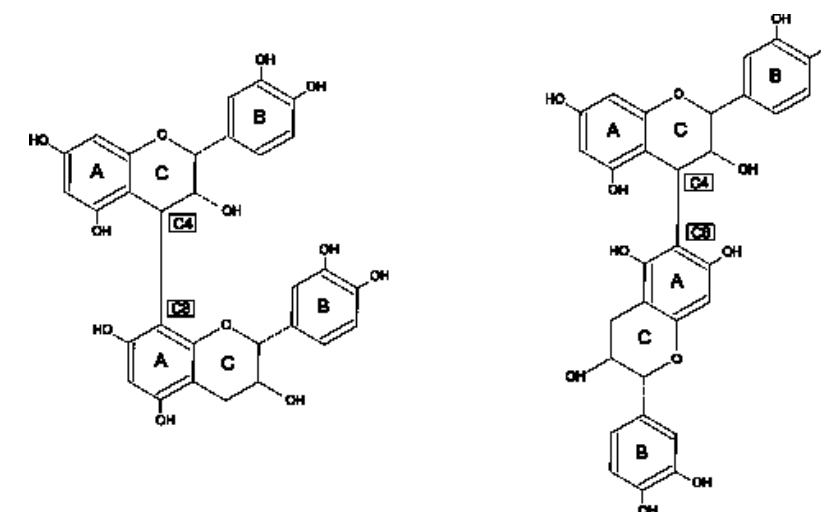


Figura 1.12: Tipos de uniones entre monómeros presentes en los proantocianidinas de la uva

<sup>6</sup> Isómeros ópticos son aquellos compuestos que tienen igual fórmula química pero distinta estructura molecular. Todos sus átomos se unen en la misma posición y manera pero no se pueden superponer, uno es la imagen especular del otro.



Las características químicas de las proantocianidinas (oligómeros y polímeros) están dadas por cuatro factores: a) naturaleza de las unidades constitutivas (catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina), b) presencia del sustituyente galato (galoilación), c) número de unidades monómeras (grado de polimerización) y d) tipo de unión de las unidades monómeras (4-8 o 4-6). Debido a las distintas posibilidades que se presentan dentro de cada factor y a las combinaciones posibles, entre factores, existe una gran diversidad de formas de proantocianidinas que pueden encontrarse. Muchas de estas formas están presentes en la uva y pasan al vino, otras se forman durante la evolución del vino. Las proantocianidinas y catequinas están presentes en la película y en la semilla de la baya de uva. Existen además en los escobajos y otros órganos herbáceos de la vid. Los de las películas y semillas se diferencian tanto en lo que respecta a los contenidos presentes como a su estructura. En la Tabla 1.2 se indican estas características diferenciales.

Tabla 1.2: Características diferenciales de las proantocianidinas presentes en hollejos y semillas de uva (Moutounet et al., 1996)

	Hollejo	Semilla
Prodelfinidina	Presente	no hay
Galoilación	1 – 14%	22 - 47%
Grado medio de polimerización	12 – 45 unidades	8 – 16 unidades
Contenido de oligómeros < 5 unidades	Débil	Elevado

En el hollejo, los contenidos de tanino son menores que en la semilla pero éstos están más polimerizados y tienen algo de prodelfinidina; su grado de galoilación es muy débil con respecto a la semilla. Aparentemente la proporción de las diferentes estructuras químicas presentes en la uva depende del patrimonio genético del cepaje. Para un mismo cepaje el contenido de los diversos constituyentes fenólicos de la uva está condicionado por factores agronómicos (tipo de manejo y condiciones climáticas y de suelo). Los taninos son sintetizados durante la primavera (época de crecimiento herbáceo de la baya) y su síntesis finaliza poco después del envero. A partir del fin del envero los contenidos totales de taninos en la uva ya se han logrado y no cambian durante el proceso de maduración de la uva (Ojeda, 1999). Las diferencias de astringencia que se observan en vinos que provienen de uvas con distinto grado de madurez, pueden atribuirse más a cambios en la extractabilidad de los taninos que a diferencias en los contenidos totales. Se citan contenidos de proantocianidinas de 0 a 100 mg L<sup>-1</sup> en vinos blancos y de 1500 a 5000 mg L<sup>-1</sup> en vinos tintos (Cheynier et al., 1998).

## 1.2 LOS TANINOS Y ANTOCIANOS EN LA ESTRUCTURA CELULAR DE LA BAYA

En las uvas tintas, los antocianos se encuentran localizados en las vacuolas de las células del hollejo, aunque en las variedades tintoreras, también existen en las células de la pulpa. El hollejo o hipodermis se forma desde el envero, a partir de las células más externas del mesocarpio. Estas células mantienen un tamaño reducido, con paredes gruesas y contienen una gran vacuola, que ocupa la mayor parte del volumen celular. La presencia de antocianos está generalizada en estas células, pero la forma en que aparecen estas sustancias varía entre las distintas células. Amrani-Joutie y Glories (1996), aislando protoplastos del hollejo encontraron que, en algunas vacuolas, los antocianos estaban dispersos en la solución vacuolar, presentando colores diversos, desde el rosado claro al rojo oscuro. Los autores atribuyeron estas diferencias a variaciones en el pH del jugo vacuolar (pH medio 2,4), a la concentración y tipo de antocianos y al grado de copigmentación. También encontraron otros protoplastos, en cuyas vacuolas aparecían los antocianos concentrados en conglomerados más oscuros, homogéneos y con una superficie irregular. Estos conglomerados ya habían sido observados por Merlin et al. (1985), quienes los habían identificado como organelas y denominado "antocianoplastos". En realidad estos cuerpos carecen de membrana y es más probable que su ocurrencia esté asociada a la existencia de gutículas lipídicas dentro de las vacuolas. La rapidez con la que los antocianos difunden durante la primera etapa de la maceración apoya la hipótesis de considerarlos como solutos químicos del solvente vacuolar (Amrani-Joutie y Glories, 1994). Desde el punto de vista químico los antocianos vacuolares se encuentran acilados con glucosa y esterificados con los ácidos cafeico, tartárico o acético.

Los taninos están localizados en el hollejo y en la semilla de la baya de uva. En el hollejo, aparecen en las células de la epidermis y de la hipodermis. En esta zona existen células con y sin tanino. Amrani-Joutie et al. (1994) utilizando técnicas de microscopía óptica y electrónica descubrieron que el tanino del hollejo se encuentra bajo las siguientes formas:

- *Tanino libre dentro del jugo vacuolar*: se visualiza al microscopio como gránulos, tanto más grandes cuanto más externa es la capa de células. En algunas células, las vacuolas tienen a la vez tanino y antocianos libres.
- *Tanino ligado a la membrana interna de la vacuola (tonoplasto)*: ligado fuertemente con las proteínas del tonoplasto.
- *Tanino ligado a la pared celular*: este tipo de tanino está preferentemente asociado a los polisacáridos de la pared por uniones con la β-glucosa y β-galactosa. No se excluye la presencia de pequeñas cantidades de moléculas de proantocianidolés libres dentro de la pared.

En la semilla, los taninos se localizan en las células de la epidermis, de la envoltura externa y de la envoltura interna. A medida que avanza la maduración, las semillas se cubren de una capa cada vez más gruesa de cutina, que limita la extractabilidad de los taninos (Amrani-Joutie y Glories, 1994).

Existen además taninos en los escobajos y en otros órganos herbáceos de la vid.

### 1.3 EXTRACCIÓN DE ANTOCIANOS Y TANINOS DURANTE LA MACERACIÓN

La maceración es un proceso de extracción fraccionada de la uva que involucra la difusión de sustancias desde la fase sólida (hollejos, semillas, escobajos) y su disolución en el vino (Peynaud, 1984). En el caso de los fenoles, el grado de extracción define la magnitud y la estabilidad del color, la astringencia, la estructura tánica del vino y el potencial del vino para envejecer (Zoecklein, 1991). En las vinificaciones clásicas, sólo cerca de la tercera parte del total de fenoles existentes en la uva pasa al vino. El grado de extracción de las sustancias fenólicas depende de varios factores que inciden en diversa medida, según el tipo de sustancia de que se trate. Entre los factores de extracción pueden citarse la fuerza con que está retenida la sustancia, la afinidad entre soluto y solvente, el tiempo de extracción, la temperatura, la presencia de coadyuvantes, como  $\text{SO}_2$  o enzimas pectolíticas y la manipulación de las partes sólidas. Una forma clásica de expresar la extracción de una sustancia ha sido mostrar cómo varía su concentración en el mosto-vino durante la maceración y tratar de establecer un patrón. Debe tenerse en cuenta que, la variación de la concentración no sólo depende del grado de extracción o ganancia, sino también del ritmo de pérdida. Esta pérdida puede producirse por destrucción oxidativa, por precipitación o por adsorción, y ser más o menos intensa.

Se ha observado que la extracción de los fenoles totales, a lo largo del tiempo, sigue un modelo de curva logarítmica (Ribéreau-Gayon, 1982; figura 1.13). Esto significa que al principio la extracción es muy intensa, pero con el tiempo disminuye su velocidad, o sea que se pueden distinguir claramente un período de extracción rápida y otro mucho más lenta. La extracción de taninos se ajusta a un modelo similar (Boulton, 1995); esto es razonable si se piensa que los taninos constituyen la parte mayoritaria de los fenoles del vino. Los taninos están sujetos a destrucción por oxidación-condensación-precipitación, pero el fenómeno es bastante lento en situaciones normales, y el patrón de cambio de concentración durante la maceración explica sobre todo la extracción.

Con respecto a los antocianos, muchos autores han determinado que las concentraciones de antocianos durante los primeros días de maceración siguen un modelo de crecimiento parecido al de los taninos, pero luego de alcanzar un valor máximo, disminuyen paulatinamente (Amrani-Joutei y Glories, 1994; Ribéreau-Gayon, 1982; Somers y Evans, 1979; figura 1.13). Los antocianos son muy reactivos y el patrón de evolución de la concentración durante la maceración es una combinación de los fenómenos de ganancia y de pérdida. La pérdida se debe a la adsorción sobre las levaduras y sobre las partes sólidas de la uva, a una pequeña degradación y a su inclusión en los cristales de bitartrato de potasio, que se forman a medida que aumenta el tenor alcohólico (Parley, 1997). Los antocianos, toman parte en reacciones de polimerización con las proantocianidinas de la uva y con el acetaldehído formado por las levaduras. Durante la fermentación, estos polímeros pueden combinarse con las proteínas y volverse insolubles, o con los polisacáridos, que en parte precipitan debido al contenido creciente de alcohol. El aumento en el contenido de alcohol también provoca una pequeña disminución de los efectos de copigmentación y autocopigmentación; y esto también aporta a la disminución del color (Somers y Evans, 1979).

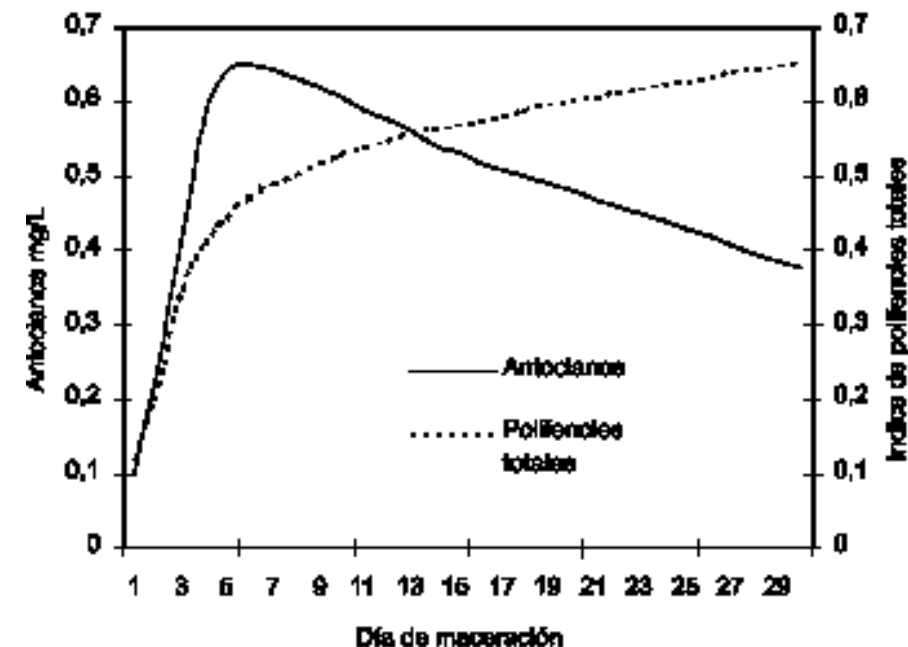


Figura 1.13: Evolución del contenido de antocianos y polifenoles totales durante la maceración de un vino tinto según Ribéreau-Gayon (1982)

La rapidez con que los antocianos son extraídos se debe a su alta disponibilidad, pues están disueltos en el jugo vacuolar. Su difusión requiere la desorganización de las estructuras celulares y la pared celular. La difusión se favorece mediante la homogeneización y el regado del sombrero. La falta de alcohol, al principio de la vinificación, no es un obstáculo para la extracción, pues los antocianos son muy hidrosolubles.

En cuanto a los taninos, la primera etapa, de difusión rápida, corresponde sobre todo a los taninos de los hollejos, que están más disponibles. Los taninos de las semillas se difunden más lentamente y requieren un mayor contenido de alcohol para asegurar su disolución. Una importante extracción de catequinas y taninos de las semillas es un rasgo propio de las vinificaciones con una maceración extendida. Las curvas de extracción de semillas solas, en soluciones modelos, se ajustan muy bien con las curvas de extracción de proantocianidinas en el vino, indicando que las semillas son la fuente más importante de taninos (Amrani Joutei y Glories, 1994; Boulton, 1995). La extractibilidad de los taninos depende de su estado y localización; los taninos ligados en el tonoplasto (membrana vacuolar) y en la pared celular son difícilmente extractables sin la intervención de enzimas apropiadas (de la uva o agregadas). La utilización de enzimas pectolíticas durante la maceración favorecería la destrucción de las paredes celulares y permitiría la liberación de taninos ligados a los polisacáridos y a las membranas vacuolares, así como de las grandes moléculas de taninos libres intravacuolares, menos agresivos hacia las proteínas y por lo tanto menos astringentes. La extracción de taninos se ve favorecida por maceraciones prolongadas, alto contenido de etanol, que solubiliza a estos compuestos, altos niveles de  $\text{SO}_2$ , que permeabiliza las membranas celulares, y alta temperatura. Durante las primeras fases de la maceración, son preferentemente extraídos los taninos de la película, ricos en prodelfinidinas y pobremente galoilados<sup>7</sup>. Si la

<sup>7</sup> Galoílado indica la unión del ion galato en la molécula.

maceración se prolonga, aumenta la extracción de taninos de las semillas fuertemente galoilados.

Amrani-Joutei y Glories (1994) macerando hollejos en soluciones similares al vino, encontraron que la extracción, tanto de antocianos y como de taninos, seguía un patrón muy parecido al de la extracción de antocianos durante la vinificación clásica. Esto significa que se alcanzaba un máximo a las pocas horas de iniciada la maceración y luego los contenidos disminuían paulatinamente, por adsorción sobre las partes sólidas. Las curvas de extracción diferían en que, la difusión inicial de antocianos era más rápida que la de taninos y la caída del contenido de taninos era menor que la de antocianos, cuando en la solución extractante existía una cantidad apreciable de alcohol. Las cantidades extraídas en el pico máximo fueron cercanas al 80% para taninos y antocianos, respecto de sus reservas tecnológicas, valores que indican una muy alta difusibilidad. Estos mismos autores, macerando semillas en similares condiciones, observaron que la tasa de extracción de los taninos fue mucho más lenta que la de los taninos de los hollejos, pero su concentración nunca disminuyó. Las cantidades extraídas en soluciones acuosas no superaron el 50% de la reserva tecnológica, aunque debe tenerse en cuenta que esta reserva era aproximadamente diez veces más grande que la de los hollejos. Las menores tasas de extracción de los taninos de las semillas demuestran su menor disponibilidad debido a la barrera contra la difusión que establece la cutina. El alcohol, en este caso, es indispensable como solvente y extractante. Estos autores también encontraron diferencias de extractabilidad en los taninos del hollejo, debidas al grado de madurez de la uva; la cual crecía a medida que avanzaba la maduración debido a la actividad pectolítica que se desencadena en el nivel de las paredes celulares.

Numerosos autores han determinado que un mayor tiempo de contacto con los orujos origina más color, más flavonoides, más taninos, menos antocianos monoméricos y más fenoles poliméricos y color polimérico (Scudamore-Smith *et al.*, 1990; Kantz y Singleton, 1991; Kovac *et al.*, 1992, Sims y Bates, 1994; Auw *et al.*, 1996). Los vinos se pueden volver más astringentes, con más intensidad aromática, luego, con un mayor tiempo de contacto aún, el aroma se hace menos frutado. La astringencia generalmente no se hace excesiva a medida que pasa el tiempo, y aun puede decrecer (Schmidt y Noble, 1983; Scudamore-Smith *et al.* 1990; Sims y Bates, 1994). La extracción de fenoles monoméricos y poliméricos generalmente se incrementa con el tiempo de contacto y las cantidades extraídas en el vino son proporcionales a los contenidos en las uvas para ambos grupos (Kantz y Singleton, 1991).

La temperatura de maceración es un factor que influencia la extracción. Un incremento de la temperatura tiene el efecto de degradar las paredes celulares, incrementando la difusión y la acción de enzimas, como las pectolíticas. Se ha observado que la tasa de extracción de fenoles de los orujos se incrementa significativamente con el aumento de la temperatura (Ramey *et al.*, 1986; Merida *et al.*, 1991). Esto también se ha observado en semillas (Singleton y Draper, 1964; Oszmianski *et al.*, 1986). Lee *et al.* (1977) encontraron un incremento lineal en la extracción de color con el incremento de la temperatura de fermentación de 15 a 33° C. Algunos autores consideran que, con temperaturas menores a 25° C durante la fermentación se producen vinos bajos en fenoles, pero altos en aromas frutados; con temperaturas mayores a 28° C se producen vinos más tánicos, con menos aromas frutados, aunque posiblemente con mayor complejidad aromática (Zoecklein, 1991).

## 1.4 REACTIVIDAD QUÍMICA DE LOS TANINOS Y ANTOCIANOS DE LA UVA

### Equilibrio de los antocianos de acuerdo al pH

Los antocianos son solubles en agua y en este medio están sujetos a transformaciones estructurales que determinan su color y estabilidad. La porción aglicona (sin azúcar) de la molécula es muy reactiva, pero los grupos sustituyentes, hidroxilo, metoxi y azúcar, modifican su reactividad cambiando la distribución de electrones de la molécula. En soluciones acuosas levemente ácidas a temperatura ambiente, los antocianos existen básicamente como cuatro formas que están en equilibrio. Estas son, la base quinoidal azul (A), el catión flavilium rojo (AH<sup>+</sup>), la base hemiacetal incolora (B) y la forma chalcona incolora (C) (Brouillard y Delaporte, 1977; figura 1.14).

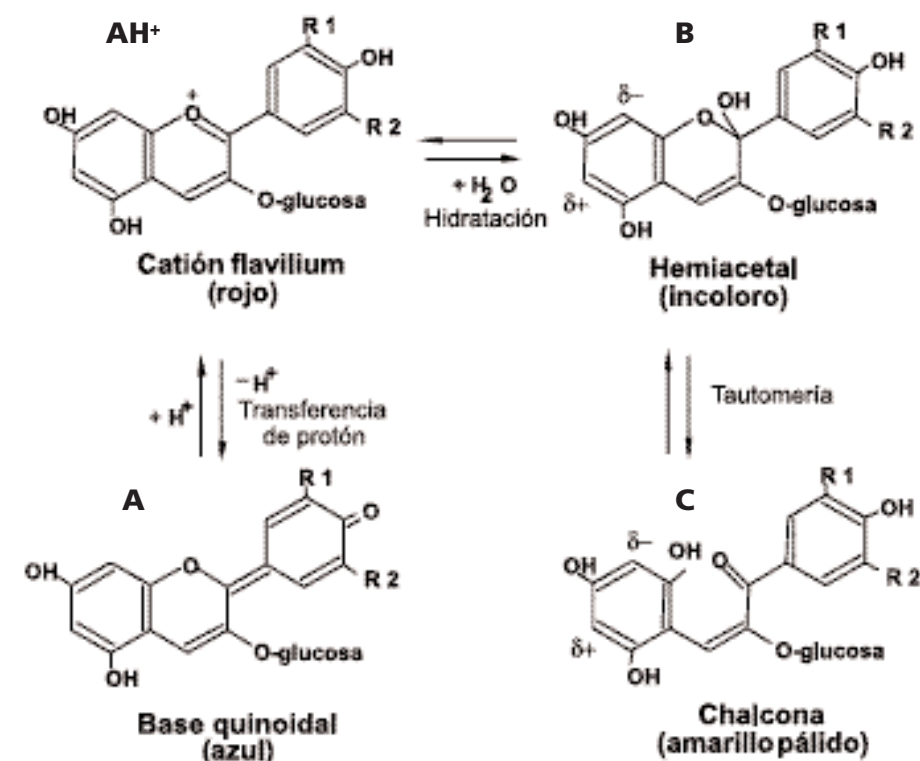
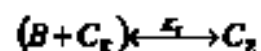
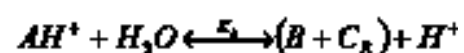
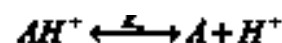


Figura 1.14: Equilibrios de los antocianos en soluciones acuosas (Brouillard y Dalaporte, 1977)

Algunas de estas formas son importantes en las condiciones de pH y temperatura del vino. La base quinoidal existe como una mezcla de tres formas, las cuales están en equilibrio con el catión flavilium. Estas formas quinoidales corresponden a la pérdida de un protón del grupo oxhidrilo en el carbono 4', 5 o 7. Una proporción apreciable de estas estructuras quinoidales sólo se encuentran a pH mucho más básicos que los encontrados en los vinos o en las vacuolas de los hollejos. También se encuentra en equilibrio con el catión flavilium, la base hemiacetal incolora, que se forma por un ataque nucleofílico del agua sobre el carbono 2. La base hemiacetal, a su vez, se encuentra en equilibrio rápido con la forma cis-chalcona de anillo abierto (C<sub>1</sub>). La cis-chalcona se mantiene en un equilibrio lento con la tras-chalcona (C<sub>2</sub>). Las reacciones de equilibrio entre las distintas formas se pueden resumir así (Brouillard y Delaporte, 1977; Brouillard y Lang, 1990):



AH<sup>+</sup>: catión flavilium rojo

A: base quinoidal azul

B: hemiacetal incoloro

C<sub>1</sub>: cis-chalcona de anillo abierto

C<sub>2</sub>: tras-chalcona

Los equilibrios de estas reacciones están influenciados por el pH. En la figura 1.15 se muestra que en el rango de pH de los vinos (3,2 a 3,9), sólo alrededor del 20% del total de los antocianos monoméricos están presentes en la forma flavilium roja y cerca del 75% se encuentra bajo la forma hemiacetal no coloreada. El resto está casi todo en forma chalcona de anillo abierto (casi incolora), y una muy pequeña cantidad puede estar presente como forma quinoidal azul. En el pH de la vacuola (alrededor de 2), predomina la forma flavilium roja. La forma chalcona es un poco menos estable que las formas hemiacetal y flavilium, y su formación se ve favorecida por pH alto y altas temperaturas, debido a la alta entalpía que requiere la reacción. La figura 1.15 también muestra que las soluciones acuosas de antocianinas pueden actuar como una especie de indicador de pH, cambiando del rojo al azul a medida que el pH se incrementa. Cuanto más alto es el pH del vino, el equilibrio se desplaza más hacia la formación de hemiacetal primero y de chalcona después. Esto conduce a la pérdida de la glucosa en el C3, con la consecuente pérdida de estabilidad de la molécula. La forma chalcona se caracteriza por la apertura del anillo pirilio en el C2. Esto destruye la configuración planar de la molécula y permite su rotación y escisión. Este mecanismo, que no es oxidativo, es uno de los más frecuentes en la degradación de los antocianos del vino. La distribución de los equilibrios en función del pH puede observarse en la figura 1.15.

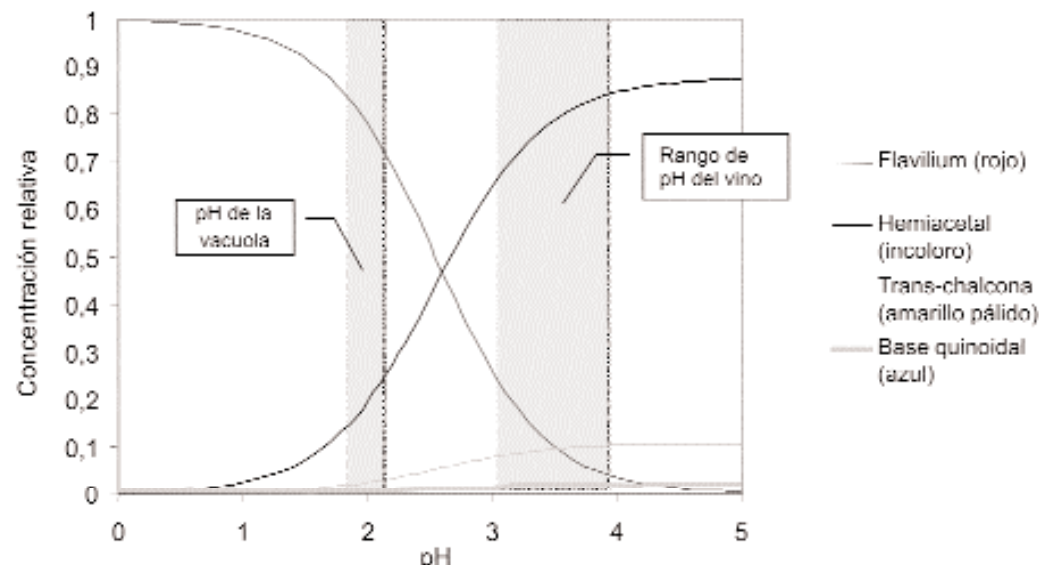


Figura 1.15: Distribución de los equilibrios de las principales formas de malvidina-3-mo-noglucósido en función del pH, a 25° C (Brouillard y Delaporte, 1977)

### Efecto del dióxido de azufre sobre los antocianos

El SO<sub>2</sub>, agregado al vino como antiséptico y antioxidante, se liga a los antocianos rápidamente dando un compuesto incoloro. La unión se produce entre una molécula de

metabisulfito y el carbono 4 de una molécula de antociano (figura 1.16).

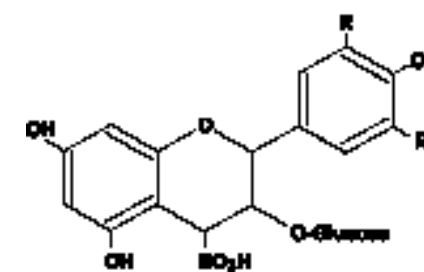
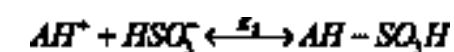


Figura 1.16: Compuesto de adición bisulfito-antocianina incoloro.

La reacción es reversible y puede ser escrita como:



La constante de equilibrio de esta reacción es grande, indicando que pequeñas cantidades de SO<sub>2</sub> pueden decolorar grandes cantidades de antocianos (Timberlake y Bridle, 1967). El bisulfito reacciona rápidamente con el flavilium y la reacción inversa es igual de rápida, si el bisulfito es removido del medio. K<sub>5</sub> es aparentemente dependiente del pH. Esto se debe al hecho de que el SO<sub>2</sub> mismo existe en un equilibrio en el vino y cuando el pH baja, este equilibrio cambia de la forma bisulfito (que reacciona con los antocianos) a la forma molecular SO<sub>2</sub> (que no reacciona). La forma incolora de adición con el bisulfito sólo está en equilibrio con la forma flavilium (Somers y Verette, 1988). Se ha observado que la influencia del SO<sub>2</sub> libre es mucho más grande que la del pH, en el equilibrio y decoloración de los antocianos del vino (Somers y Westcombe, 1982).

### Copigmentación y autocopigmentación de los antocianos:

Los antocianos en soluciones acuosas concentradas, y en presencia de ciertos compuestos fenólicos incoloros conocidos como copigmentos, tienden a formar apilamientos lábiles que producen una intensificación del color y un aumento de las tonalidades azul y violeta. Este fenómeno es conocido como copigmentación (Asen *et al.*, 1972). La intensificación del color puede ser de entre 2 a 6 veces, con respecto a la de los antocianos sin copigmentar. Este fenómeno justifica hasta el 40% del color de los vinos jóvenes, de menos de 6 meses de edad (Boulton, 2001). Los copigmentos son generalmente compuestos fenólicos monoméricos, como los ácidos hidroxicinnámicos, las catequinas y los flavonoles. No existe evidencia de que los taninos puedan actuar como copigmentos (Boulton, 1999b). El color atribuible a la copigmentación se pierde con la dilución. Esta particularidad, se manifiesta como una violación de la ley de Beer, que establece una relación lineal entre las concentraciones de un soluto ópticamente activo y su absorbancia lumínica. Esta excepción, que permitió el descubrimiento de la copigmentación, ha hecho posible su medición en el vino. El aumento en el color debido a la copigmentación, o hiper Cromismo, es acompañado generalmente de un aumento en la longitud de onda de absorbancia máxima (efecto batocromo), en 20 nm aproximadamente. Esto significa la expresión de tonos azules y morados en los vinos tintos, con un alto nivel de copigmentación. Existe evidencia que el apilamiento entre antociano y copigmento se produce por interacciones hidrofóbicas, como puentes de hidrógeno, y no

por uniones covalentes. De ahí que estas asociaciones puedan ser perturbadas por la dilución. Durante el primer año de estacionamiento del vino los antocianos monoméricos –copigmentados o libres– se polimerizan con los taninos en una alta proporción. Las consecuencias de este proceso son la pérdida de la copigmentación y la caída de la intensidad colorante del vino de hasta un 50%. Parece ser que la formación de pigmento polimérico rojo está asociada a la cantidad de copigmentación inicial. Esto se debería a que los apilamientos copigmentados protegerían a los antocianos contra la oxidación y favorecerían la formación de uniones covalentes entre taninos y antocianos (Boulton, 2001). Esta teoría no ha sido aún probada en forma concluyente. También parece que los antocianos que están copigmentados son más resistentes a la degradación, evitándose la hidratación del flavilium a hemiacetal, que es el paso previo a la formación de chalcona (Mazza y Brouillard, 1990).

Los antocianos (A) y los copigmentos (Cp) están en un equilibrio fácilmente dissociable, como se muestra a continuación (Brouillard *et al.*, 1989):



Dentro de los copigmentos que aparecen en el vino, las flavonoles quercetina y kaempferol, tienen un efecto fuerte; las catequinas, un efecto moderado y los ácidos hidroxycinnámicos, cafeico y caftárico, y el ácido gálico, un efecto débil. Si bien las catequinas tienen un poder moderado como copigmentos comparándolas con los flavonoles, debe tenerse en cuenta que en el vino existen 10 veces más catequinas que flavonoles. La estructura y concentración de los copigmentos, de los antocianos y el pH de la solución tienen un efecto notorio sobre el grado de copigmentación (Davies y Mazza, 1993). Para muchos pares antociano-copigmento, el pH de máxima copigmentación se encuentra entre 3,2 y 4,7. Parece que la mayoría de los vinos están limitados en la formación de complejos de copigmentación, no por la disponibilidad de antocianos o el pH, sino por la disponibilidad de copigmentos, esto queda evidenciado por la capacidad de aumentar el color por el agregado de copigmentos (Boulton, 1999a; Boulton, 1999b).

El color de un vino joven está dado por la suma de pigmento libre, pigmento copigmentado y pigmento polimérico. Debido a la débil unión que otorga la copigmentación, cuando se provoca una dilución de a 25 veces con un buffer de pH y alcohol constante, se rompe la copigmentación y el color sólo se debe al pigmento libre polimérico y a las antocianinas totales. Boulton (1999a) utilizando esta propiedad determinó que, en vinos Pinot Noir jóvenes, el color debido a la copigmentación era cercano al 30% del color total, en promedio. También encontró que las variaciones en el porcentaje de copigmentación eran altas (>50%) y se debían a las diferencias de zona de origen de la uva, portainjerto y manejo del viñedo.

Un fenómeno relacionado con la copigmentación, que también se da en soluciones acuosas concentradas, es el de la autoasociación o autocopigmentación, en donde los pigmentos forman agregados o apilamientos con ellos mismos. En estudios sobre los equilibrios de los antocianos Asen *et al.* (1972), trabajando con soluciones de cianidina-3,5-diglucósido, sin la presencia de copigmentos, había notado que estos no obedecían la ley de Beer salvo a muy altas diluciones. Esto demostró que el color de los antocianos no sólo era dependiente del pH del medio acuoso, sino de la propia concentración del pigmento. Este efecto fue atribuido a la autoasociación por Asen *et al.* (1972). Estudios

posteriores demostraron que tanto el flavilium como la base quinoidal, coloreados, podían formar apilamientos entre la parte cromófora de la molécula y la porción glicosídica (figura 1.17). Esta disposición es hidrófoba y evita la hidratación y consecuente pérdida de color del anillo pirilio (Hoshino, 1991; 1992). La autoasociación ha sido encontrada en soluciones modelo conteniendo etanol, pero en menor medida que en soluciones acuosas (Mazza, 1995) por lo que su rol en el vino ha recibido poca atención. Algunas variedades de uva como Pinot Noir, carecen antocianos acilados y tienen una menor capacidad para formar compuestos de autoasociación.

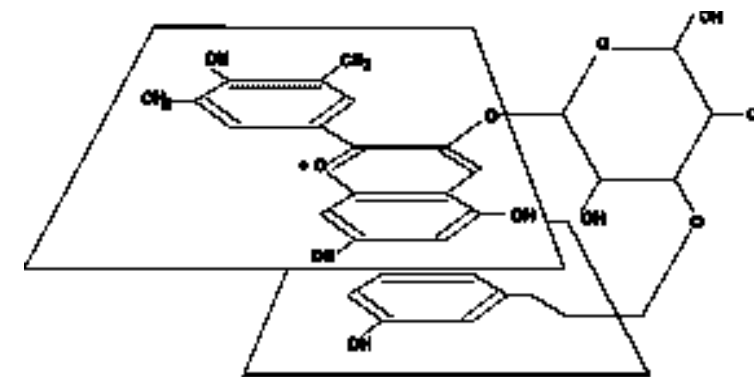


Figura 1.17: Autoasociación de malvidina-3-glucosa cumarato

### Condensación de antocianos y taninos

Durante la fermentación alcohólica y luego, durante el envejecimiento del vino, los taninos reaccionan con los antocianos, para dar compuestos coloreados, rojos, que son menos afectados por el pH y los sulfitos, que los antocianos libres. En los vinos de un año, se estima que un 50% del color puede deberse a estos agregados. En vinos más viejos esta proporción aumenta (Ribéreau-Gayon, 1982). El color rojo teja de los vinos muy viejos se debe en parte, a la existencia de estos compuestos y en parte, al color que toman los taninos al oxidarse. Los taninos también pueden condensarse con otros 3-flavonoles presentes en el vino, como catequinas monómeras u otras proantocianidinas. Este tipo de condensación entre antocianos y taninos o entre taninos y taninos es de tipo no oxidativo y conduce a un aumento en el tamaño de las moléculas.

Existen distintas posibilidades bajo las que se pueden asociar los antocianos y los taninos. Entre las principales se encuentran las adiciones antociano-tanino, las adiciones tanino-antociano y tanino-tanino y las uniones por intermedio de un puente etanal.

*Adición antociano-tanino (A – T):* en la figura 1.18 se muestra un esquema de esta reacción. La adición ocurre entre el catión flavilium, que juega un papel electrófilo (en el C4 del su anillo heterocíclico) y el tanino, que actúa como nucleófilo en el C6 o el C8 del anillo A. El compuesto de adición formado toma una coloración rojo anaranjada luego de oxidarse. El aumento del color que ocurre luego del primer trasiego en presencia de oxígeno podría deberse en parte a este fenómeno.

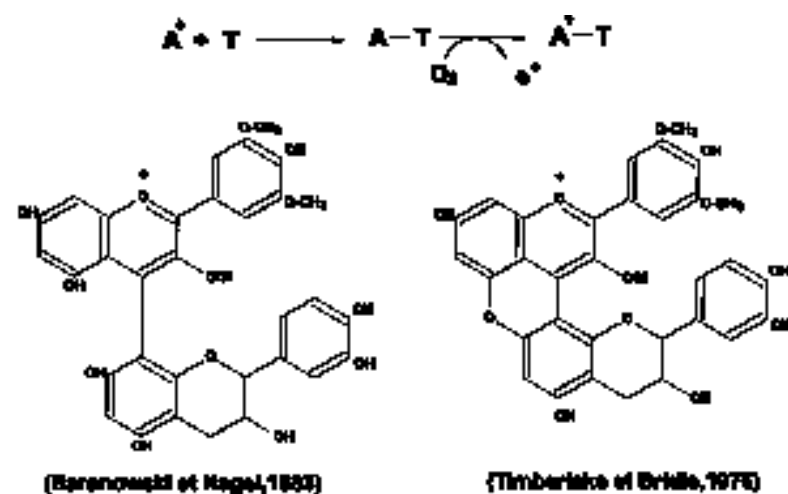


Figura 1.18: Adición antociano-tanino y compuestos formados

*Adición tanino-antociano (T – A) o tanino-tanino (T – T):* la figura 1.19 muestra el esquema de esta reacción. En este caso el electrófilo es un carbocatión, con la carga positiva situada en el C4 del núcleo heterocíclico, liberado por la ruptura de uniones interflavánicas de los taninos. Este carbocatión puede reaccionar con el nucleófilo (C6 o el C8 del anillo A) de un antociano o de otra molécula de 3-flavanol. Los compuestos formados con los antocianos, también son de color rojo anaranjado y contribuyen al color de los vinos viejos. Las adiciones T – T conducen a la formación de nuevas proantocianidinas. Los procesos de ruptura y recombinación pueden conducir en algunos casos a un aumento del grado de polimerización de los taninos. También se ha citado que cuando en el vino hay un exceso de 3-flavanoles monómeros esta vía de reacciones puede conducir a una disminución del grado de polimerización (Cheynier et al., 1998).

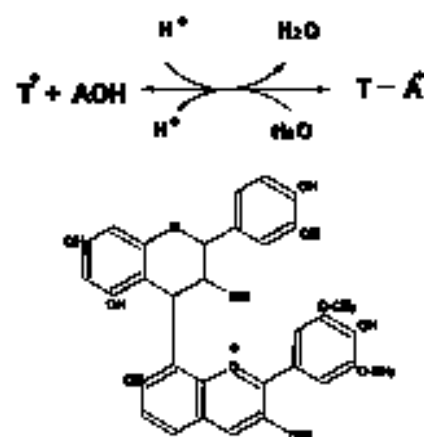


Figura 1.19: Reacción de adición tanino - antociano y compuesto formado (Haslam, 1980)

*Condensación antociano-tanino por intermedio de un puente etanal:* las reacciones precedentes son lentas en formarse, pero se hacen más rápidas en presencia de etanal.

El compuesto formado (T – etanal – A) tiene una coloración rojo violeta intensa. Se cree que este color puede deberse a fenómenos de copigmentación intramolecular, pues la molécula es lo suficientemente larga como para poder plegarse sobre sí misma y formar un paquete, similar al que se forma durante la copigmentación propiamente dicha. La figura 1.20 muestra el compuesto formado en esta reacción.

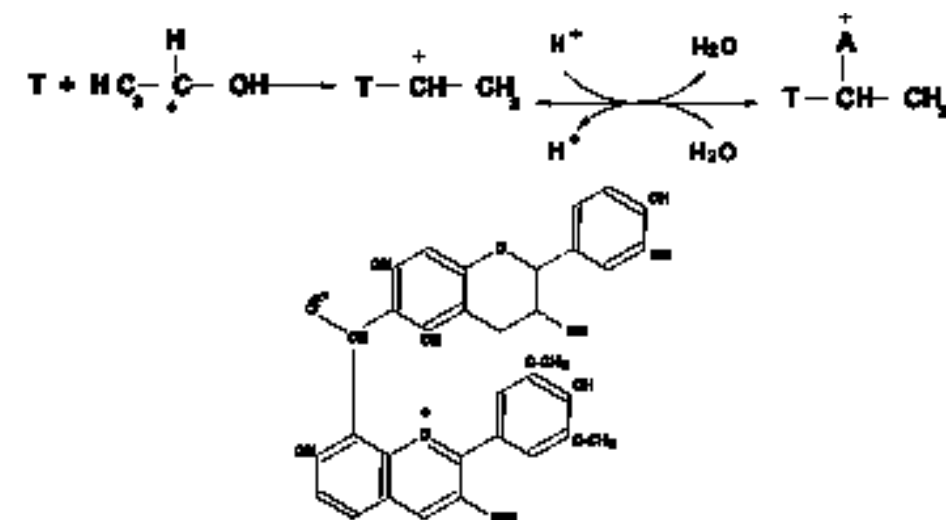


Figura 1.20: Condensación tanino-antociano mediante un puente etanal (Timberlake y Bridle, 1976)

#### Oxidación de antocianos y taninos:

Los antocianos y las proantocianidinas tienen propensión a oxidarse, debido a la facilidad con que los anillos ortodifenoles, presentes en el ciclo B o en el anillo del galato, se transforman en quinonas o semiquinonas. En general, las oxidaciones de los taninos son promovidas por la presencia de enzimas polifenoloxidasas. La oxidación es favorecida por la presencia de ácidos hidroxicinnámicos, metales catalizadores (Fe, Cu), oxígeno disuelto, altas temperaturas y pH elevado (>3,6). Los productos de la oxidación son de color pardo y son muy propensos a condensarse y precipitar.

La presencia de polifenoloxidasas provenientes del ataque de *Botrytis* (lacasa) o propias de la uva (tirosinasa) está estrechamente asociada con estos fenómenos de oxidación. La oxidación puede realizarse aún sin estas enzimas aunque, en general, en una forma más lenta. La presencia de ácidos hidroxicinnámicos, como caftarico y cafeoil tartárico, juega un rol importante en estas reacciones, pues actúan como un motor de la oxidación de los fenoles, oxidándose y reduciéndose alternativamente durante todo el proceso, sin consumirse ellos mismos. El pH elevado permite una mayor concentración de sustrato oxidable, que es la forma fenolato del dihidroxifenol (el equilibrio dihidroxifenol/fenato tiene un pK entre 9 y 10). Los cationes metálicos como  $Fe^{+2}$  intervienen reaccionando con el  $O_2$  para producir el radical superóxido que actúa como oxidante.

En la figura 1.21 se presenta un esquema abreviado del proceso de oxidación de las proantocianidinas, según Moutounet (2000).

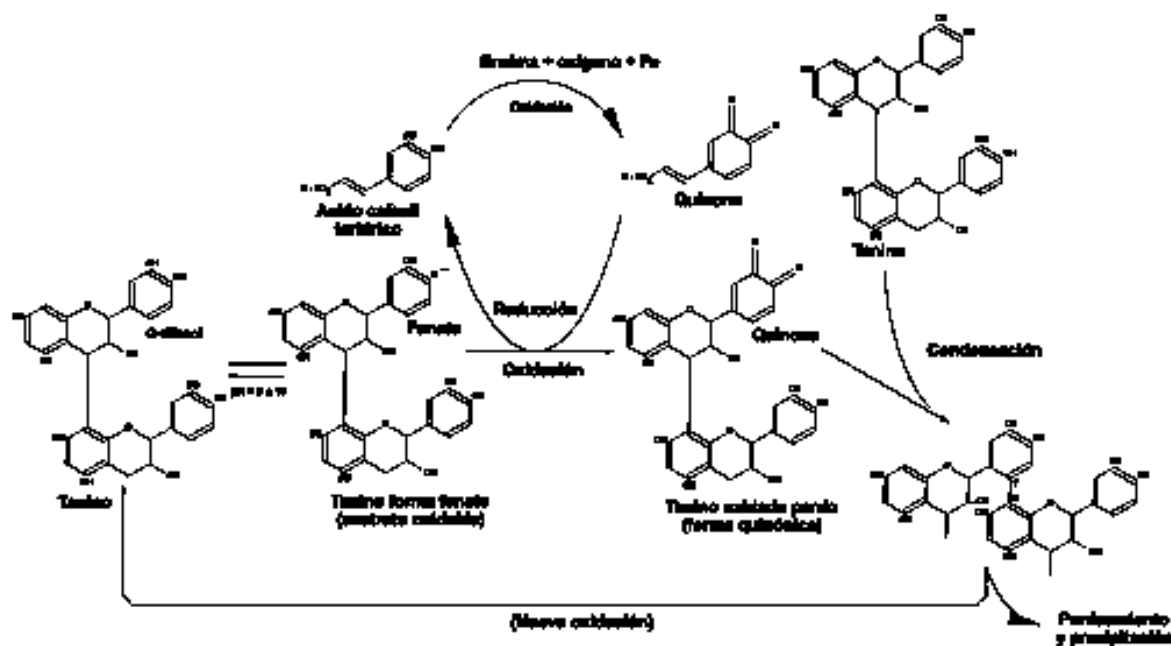


Figura 1.21 Esquema de la oxidación de las proantocianidinas

### Interacciones de los taninos con las proteínas y los polisacáridos. Astringencia de los taninos

La capacidad de los taninos para precipitar las proteínas salivares es causante de la sensación de astringencia que producen los vinos tintos. Esta sensación se define como una impresión de sequedad en el interior de la boca (Noble, 1990). Numerosos autores han encontrado una asociación positiva entre el contenido global de taninos y la intensidad de la sensación astringente (Cravero, 1996; Brossaud, 1999; Brossaud *et al.*, 2001). Por otro lado, cuanto mayor es el grado de polimerización de las proantocianidinas mayor es la sensación de astringencia (Peleg *et al.*, 1999). Esto se explica por el comportamiento químico de los taninos. Se ha observado que los taninos de peso molecular muy alto y muy galoilados precipitan las proteínas de la saliva, mientras los taninos menos polimerizados no lo hacen (Sarni-Manchado *et al.*, 1999a). Este tipo de taninos tienen también la capacidad específica de precipitar otras proteínas globulares como la gelatina (Sarni-Manchado *et al.*, 1999b). Cuando se agrega gelatina a un vino, debido a la pérdida de éste tipo de taninos, disminuye perceptiblemente la astringencia. Si se analizan los precipitados formados por los taninos y las proteínas del clarificante, se advierte que se trata de los taninos de mayor peso molecular y más galoilados (Maury *et al.*, 2001).

Actualmente, el modelo explicativo sobre las propiedades de los taninos en el vino indica que estos, luego de sufrir distintos procesos de polimerización y condensación, se reúnen en agregados cada vez más grandes mediante uniones hidrófobas, hasta formar partículas con propiedades coloidales. Estos agregados coloidales eventualmente seguirán creciendo y terminarán precipitando. Si los agregados coloidales toman contacto con proteínas, son capaces de formar agregados más grandes que también precipitan. Las uniones entre taninos y proteínas se explican por la facilidad que tienen para for-

mar puentes de hidrógeno, interacciones hidrófobas y uniones iónicas (Saucier, 1997). La cantidad de o-difenoles y o-trifenoles accesibles en los taninos parece tener un rol preponderante en este tipo de reacciones (Maury *et al.*, 2001). Por otro lado, los polisacáridos tienen la capacidad de formar uniones con los taninos más pequeños e impiden que crezcan los agregados de taninos, a la vez que bloquean los puntos activos que precipitan las proteínas y causan la sensación astringente (Saucier, 1997; Saucier *et al.*, 2000). Los polisacáridos del vino son macromoléculas que provienen de las disgregaciones de la pared de la levadura (manoproteínas) y de la pectina de la pared celular de la baya (arabino-galactanos, arabinogalactano-proteínas y ramno-galacturonanos I y II; Doco *et al.*, 2000). Estas sustancias cumplen una función protectora al evitar la precipitación de los taninos y de las uniones de taninos y antocianos. También tienen un efecto suavizante frente a la astringencia de los taninos. El agregado de goma arábiga al vino, cumple una función similar. La figura 1.22 presenta un esquema de este modelo del comportamiento coloidal de los taninos (Saucier *et al.*, 2000).

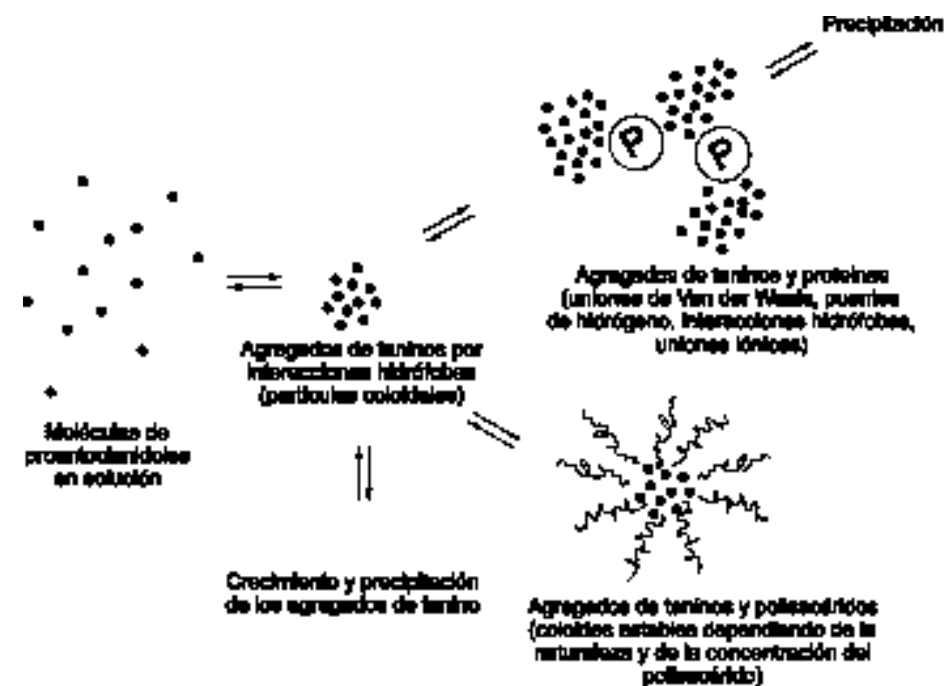


Figura 1.22 Modelo del comportamiento coloidal de los taninos.

## SECCIÓN 2: TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA EVALUACIÓN DE UVA

### 2.1. MUESTREO DE UVA A CAMPO Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Para obtener muestras de uva representativas del viñedo, es necesario seguir una metodología, que tenga en cuenta la pertenencia a parcelas homogéneas en cuanto a manejo, vigor, sistemas de conducción y productividad; como también el tamaño de la muestra y la forma de obtenerla.

En el campo se extrae una muestra de 200 bayas como mínimo, por cada unidad de muestreo homogénea de hasta 4 ha. Deben ser tomadas a partir de las distintas situaciones de insolación que presenten los racimos. Para lo cual, se necesita observar previamente la disposición de los racimos en la canopia, a fin de extraer bayas sombreadas y expuestas en una proporción similar a la que se presenta en el cultivo. Se extraen bayas con sus pedicelos (figura 2.1) de todas las exposiciones (*i.e.*, cara oeste y cara este) y en forma alternativa de los distintos sectores del racimo (ápice, parte central, y parte basal); utilizando una pequeña tijera. En caso de variedades con racimos muy compactos, en vez de bayas individuales se extraen raquillas con 3 ó 4 bayas. Es importante que el recorrido realizado para sacar los granos atraviese la totalidad de la parcela, evitando sacar del primer claro como del último. En el caso de parrales, el recorrido se hace por las diagonales, dibujando una V o W. En espalderos, al no poder realizar diagonales, se recorren varias hileras en la totalidad de su longitud elegidas al azar (eliminando hileras del borde de la parcela). Se pueden recorrer dos a cuatro hileras bien distribuidas por cada 2 ha de viñedo.

La muestra extraída debe ser mantenida en bolsas de polietileno (figura 2.2) dentro de conservadoras térmicas con frío, evitando encimar muchas muestras, ya que este peso produce rotura de granos y emisión de jugos a la bolsa como se observa en figura 2.5. Debe evitarse que las uvas sufran temperaturas altas y pérdidas de humedad, hasta su ingreso al laboratorio de análisis. Es necesario identificar las muestras y registrar los datos de la parcela, ya que estos tienen mucha importancia en el momento de procesar, evaluar y comparar resultados. Al ingresar la muestra en el laboratorio, debe ser registrada en un libro de ingresos, identificando variedad, fecha de recepción, fecha de extracción, parcela, ubicación geográfica del viñedo, y responsable del muestreo. En caso de no realizar las determinaciones dentro de un período de tiempo corto, deben llevarse a freezer (-21° C) para ser congeladas rápidamente, con la precaución de que no se rompa la cadena de frío hasta su utilización en los distintos análisis.

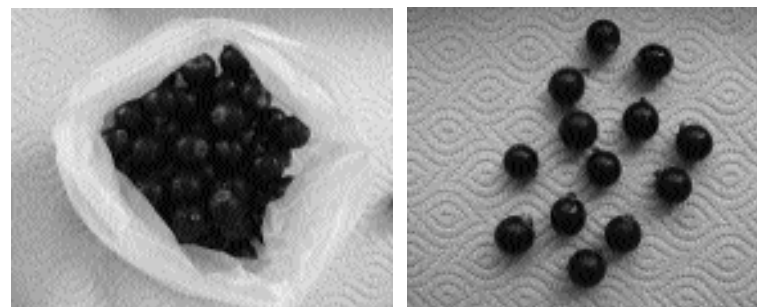


Figura 2.1: Muestra de bayas extraídas correctamente. Cada baya con su pedicelo, para evitar emisión de jugo previo a su análisis



Figura 2.2: Forma correcta de identificación de muestras de bayas en laboratorio

Es importante recalcar que la extracción de las bayas en el campo, debe ser siempre con sus pedicelos, ya que si no es de esta manera, se produce pérdida de jugos de los granos como se observa en figura 2.3. También en figura 2.4 y 2.5 se observan muestras mal extraídas y mal conservadas por aplastamiento de granos y pérdida de la cadena de frío.



Figura 2.3: Muestra de bayas mal extraídas, sin su pedicelo, en donde se observa pérdida de jugos fuera de la misma





Figura 2.4: Muestra de bayas sacadas correctamente con sus pedicelos, sin embargo mal conservadas con rotura de cadena de frío, provocando desintegración de los hollejos al intentar pelarlos

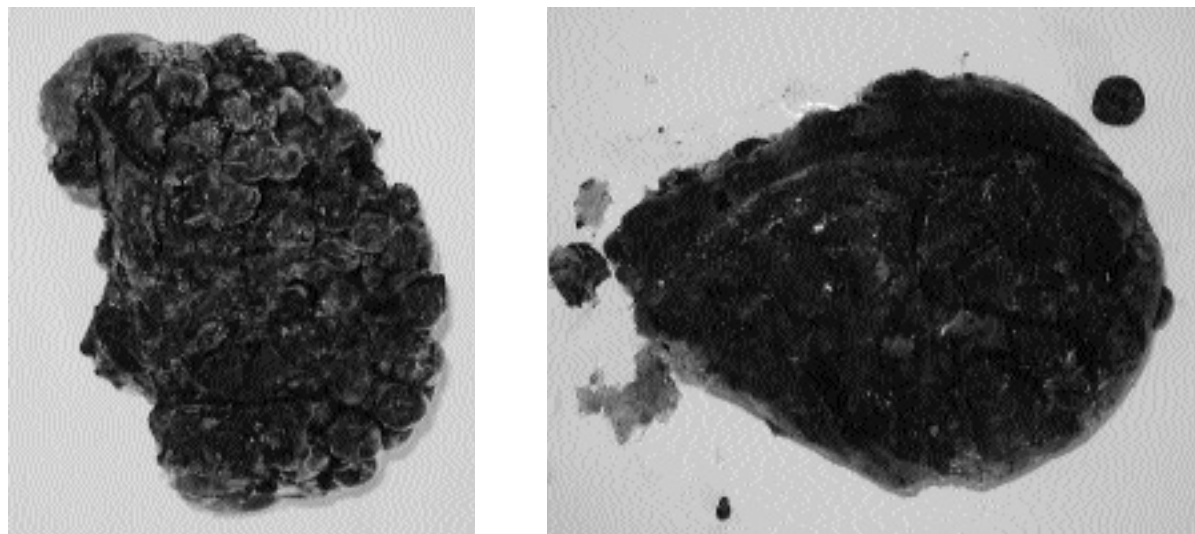


Figura 2.5: Muestras de bayas mal conservadas por aplastamiento de las bayas con emisión de jugos al exterior y rotura de la cadena de frío una vez congeladas las muestras

## 2.2 DETERMINACIÓN DE CLASE MODAL, DIÁMETRO Y PESO PROMEDIO DEL GRANO

Una de las variables tenidas en cuenta muchas veces en la evaluación de calidad de uvas es el diámetro de las mismas. El trabajo de Matthews y Anderson (1988) reportó el rol importante del diámetro de la baya en la extracción de fenoles en la vinificación. Sin embargo, en otros trabajos más recientes se ha encontrado que el diámetro de las bayas no es el factor con mayor impacto en la calidad del vino (Walker *et al.*, 2005). En ensayos de calidad realizados en el Laboratorio de Viticultura del INTA Mendoza, durante las cosechas 2005, 2006 y 2007, no se encontró relación entre el diámetro de las bayas y la composición fenólica de los vinos Malbec (e.g. índice de polifenoles totales, antocianos, taninos y catequinas).

Es importante tener en cuenta que existe una gran heterogeneidad en el tamaño y peso de las bayas dentro de un mismo racimo, así como en racimos diferentes dentro del viñedo. Esto hace que las muestras obtenidas en el campo también sean heterogéneas. Por este motivo es necesario calcular los parámetros medios de la muestra y obtener submuestras representativas para utilizarlas en los distintos análisis. Sobre todo en aquellos que utilizan un tamaño muy reducido de muestra (e.g., taninos, catequinas, antocianos y polifenoles totales).

En el laboratorio, a partir de la muestra de 200 bayas, se obtiene como submuestra representativa, la clase diametral más frecuente en la población. Esta submuestra se denomina **clase modal** y se obtiene por medio del tamizado y clasificado de la muestra.

### Materiales:

- Balanza analítica
- Serie de cinco tamices, ubicados de mayor a menor malla (figura 2.6). En la tabla 2.1, se presentan las medidas de los tamices a utilizar



Figura 2.6: Juego de tamices de madera, para tamañar bayas de uva

Tabla 2.1: Dimensiones de los tamices para clasificar bayas.

Número de tamiz (ubicados de arriba hacia abajo)	Malla (mm)	Clase de bayas que retiene cada tamiz (mm)	Punto medio de clase considerado (mm)
1	16	mayor de 16	17
2	14	16 – 14	15
3	12	14 – 12	13
4	10	10 – 12	11
5	8	8 – 10	9
6	Fondo de tamiz	menor de 8	7

**Método:**

Las bayas de la muestra representativa de la parcela se hacen pasar por el juego de tamices, para clasificarlas e identificar la clase modal. En cada clase obtenida luego del tamizado, se cuentan el número de bayas y se pesa el total de las mismas, para poder calcular diámetro y peso medio de bayas (tabla 2.2 y 2.3). La clase con mayor número de bayas, clase modal, es colocada en una bolsa de polietileno rotulada, para su posterior conservación en freezer a -21° C, hasta el momento de su utilización en los posteriores análisis. El rótulo siempre debe llevar el número de identificación de muestra del laboratorio, como así también la variedad de uva y la parcela a la cual pertenece la muestra. El resto de las clases obtenidas en los otros tamices, se junta nuevamente para ser usado de manera inmediata en la determinación de pH y Brix.

**Cálculo de resultados:**

Tabla 2.2: Cálculo de peso medio y diámetro medio de baya

Número tamiz	Clase de baya	Punto medio clase (mm)	Variables medidas		Variables calculadas	
			Cantidad de bayas	Peso total de la clase (g)	Peso medio baya (g)	Diámetro medio baya (mm)
6	menor 8 mm	7	A <sub>6</sub>	B <sub>6</sub>	Dividir: B / A	[(A <sub>6</sub> *7)+(A <sub>5</sub> *9)+ (A <sub>4</sub> *11)+ (A <sub>3</sub> *13)+ (A <sub>2</sub> *15)+ (A <sub>1</sub> *17)] / A
5	8 a 10 mm	9	A <sub>5</sub>	B <sub>5</sub>		
4	10 a 12 mm	11	A <sub>4</sub>	B <sub>4</sub>		
3	12 a 14 mm	13	A <sub>3</sub>	B <sub>3</sub>		
2	14 a 16 mm	15	A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>		
1	mayor 16 mm	17	A <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>		

A: Suma bayas B: Suma pesos

Tabla 2.3: Ejemplo de determinación de clase modal, cálculo de peso y diámetro medio

Número tamiz	Clase de baya	Punto medio clase (mm)	Cantidad de bayas	Peso total de la clase (g)	Clase modal (punto medio de la clase con más bayas)	Peso medio 1 baya (g)	Diámetro medio 1 baya (mm)
6	menor 8 mm	7	14	1,83	11	1,13	11,33
5	8 a 10 mm	9	31	7,86			
4	10 a 12 mm	11	90	109,97			
3	12 a 14 mm	13	46	65,66			
2	14 a 16 mm	15	11	23,28			
1	más 16 mm	17	8	17,50			
TOTAL			200	226,10			

En la tabla 2.4 y 2.5 se presentan valores de pesos y diámetros promedios para distintas variedades obtenidos en el Laboratorio de Viticultura del INTA Mendoza.

Tabla 2.4: Valores promedios de pesos de bayas obtenidos al momento de cosecha en el ciclo 2005-06 y 2006-07, en distintas variedades

Variedad	Cantidad de determinaciones	Peso de bayas (g)		
		Media	Intervalo 95%*	confianza
Bonarda	15	2,628	2,523	2,733
Cabernet Sauvignon	58	1,054	1,016	1,093
Malbec	379	1,706	1,679	1,734
Merlot	48	1,219	1,192	1,246
Syrah	246	1,426	1,403	1,448

\*El intervalo de confianza indica el rango de valores que puede tomar la media en la población para el nivel de confianza indicado.

Tabla 2.5: Valores promedios de diámetro de baya obtenidos al momento de cosecha del ciclo 2005-06 y 2006-07, en distintas variedades

Variedad	Cantidad de determinaciones	Diámetro de bayas (cm)		
		Media	Intervalo 95%*	confianza
Bonarda	15	1,54	1,52	1,56
Cabernet Sauvignon	58	1,05	1,04	1,06
Malbec	379	1,26	1,25	1,27
Merlot	48	1,13	1,12	1,14
Syrah	246	1,15	1,13	1,16

\*El intervalo de confianza indica el rango de valores que puede tomar la media en la población para el nivel de confianza indicado.

### 2.3 MÉTODO ALTERNATIVO PARA DETERMINACIÓN DE PESO, VOLÚMEN Y DIÁMETRO PROMEDIO DE BAYAS, MEDIANTE PROBETA Y BALANZA

Una variante para la evaluación del diámetro de las bayas es el método de la probeta. Este método consiste en introducir un número de bayas conocido en una probeta graduada de tamaño grande con un volumen de agua ya conocido. La diferencia entre el volumen del líquido en la probeta al agregar las bayas es el espacio ocupado por las mismas o lo que es lo mismo el volumen total de ellas. Con esta información se calcula de una manera rápida, el volumen medio de los granos y su diámetro, considerando que las bayas son esféricas.

#### Materiales:

- Balanza analítica
- Probeta graduada de 1 ó 2 L (A)

#### Método:

La muestra obtenida en el campo, se divide en dos submuestras de aproximadamente 100 bayas cada una, una para esta determinación y la otra para los posteriores análisis a realizar. La muestra que utilizaremos en este momento, se debe pesar en balanza analítica y luego contar el número de bayas pesadas (n). Estas bayas se introducen en la probeta graduada A (1 L ó 2 L, figura 2.7) con un volumen de líquido conocido. La diferencia entre el volumen anterior y posterior al agregado de las bayas es el volumen de las bayas contenidas en la probeta A.

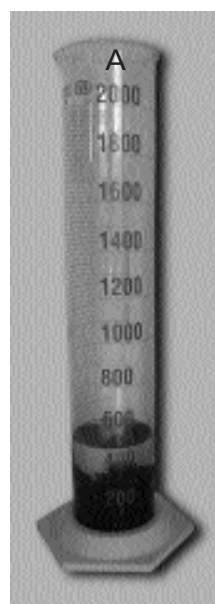


Figura 2.7: Se observa el volumen final en la probeta A, luego del agregado de un número conocido de bayas (previo al agregado de las mismas se midió un determinado volumen de agua, e.g. 100 mL)

#### Cálculo de resultados:

A partir del peso total de las bayas y su cantidad, se calcula el peso promedio de las mismas como se observa a continuación. Posteriormente con el volumen total de la muestra de uva medido en probeta se calcula para la baya su volumen, radio, diámetro y superficie promedio.

$$\text{Peso promedio de la baya (g)} = \frac{\text{Peso total de la muestra de bayas (g)}}{\text{número de bayas contadas (n)}}$$

$$\text{Volumen total de bayas (mL)} = \text{Vol. probeta A final (mL)} - \text{Vol. probeta A inicial (mL)}$$

Vol. probeta A inicial: es el volumen de agua agregado en probeta antes de la incorporación de las bayas.

Vol. probeta A final: es el volumen obtenido al agregar un número conocido de bayas.

$$\text{Volumen promedio por baya (mL o cm}^3\text{)} = \frac{\text{Volumen total de bayas (mL)}}{\text{número de bayas contadas (n)}}$$

Conociendo la fórmula para calcular el volumen de una esfera, se puede deducir el radio y diámetro equivalente de la misma (considerando bayas esféricas), con las siguientes fórmulas.

$$r = \sqrt[3]{\frac{\text{Volumen de una esfera (cm}^3\text{)} * 3}{4\pi}}$$

$$d = 2 * r$$

r: radio de la baya

d: diámetro de la baya

La superficie del hollejo del grano de uva se calcula por medio de la fórmula del área de una esfera, presentada a continuación:

$$\text{Superficie del hollejo (cm}^2\text{ por baya)} = 4 * \pi * r^2$$

## 2.4 DETERMINACIÓN DE LAS RELACIONES HOLLEJO/BAYA Y SEMILLA/BAYA

Las proporciones de hollejo y de semilla con respecto al peso total de la baya son valores a tener en cuenta para la evaluación de calidad en uva de vinificar.

### Materiales:

- Balanza analítica
- Bisturí
- Papel absorbente

### Método:

Tomar al azar y pesar en balanza 10 bayas de la clase modal conservada en freezer. A estas bayas se les extrae el hollejo con bisturí, raspando delicadamente los mismos, para evitar que queden restos de pulpa. Con ayuda de papel absorbente se secan los hollejos y luego se pesan en balanza analítica (figura 2.8). También se separan, cuentan y pesan las semillas totales de las 10 bayas. Estas semillas se limpian para evitar que queden restos de pulpa antes de pesarlas en balanza. Las semillas y los hollejos se guardan identificados en freezer, para realizar en el futuro la extracción de los compuestos fenólicos mediante el uso de solventes adecuados.



Figura 2.8: Operación de extracción de hollejos y semillas

**Cálculo de resultados (importante: tener en cuenta que estos resultados serán utilizados en posteriores determinaciones de fenoles en uva):** a partir del peso de hollejo, bayas, semillas, y número de semillas de estas diez bayas se calcula:

$$A: \text{Peso medio baya (g)} = \text{peso 10 bayas (g)} / 10$$

$$B: \text{Peso medio hollejo por baya (g)} = \text{peso hollejo 10 bayas (g)} / 10$$

$$C: \text{Peso medio semilla por baya (g)} = \text{peso semilla 10 bayas (g)} / 10$$

$$D: \text{Cantidad de semillas por baya} = \text{cantidad de semillas 10 bayas} / 10$$

$$E: \text{Relación hollejo/uva (g kg}^{-1} \text{ uva)} = (B \times 1000) / A$$

$$F: \text{Relación semilla/uva (g kg}^{-1} \text{ uva)} = (C \times 1000) / A$$

$$G: \text{Relación cantidad de bayas por kg}^{-1} \text{ uva} = 1000 / A$$

## 2.5. CONTENIDO DE AZÚCAR POR MEDIOS FÍSICOS, REFRACTÓMETRO, DENSÍMETRO O AERÓMETRO

### a) SÓLIDOS SOLUBLES

Esta determinación se basa en el índice de refracción de la luz cuando atraviesa un líquido como es el jugo de uva. Es necesario tener en cuenta que no sólo mide azúcares, sino todos los sólidos solubles en suspensión de la muestra. El valor de sólidos solubles varía notablemente con la temperatura, por lo que su determinación debe realizarse a 20° C, si no es así se corrige mediante tablas. Actualmente existen refractómetros auto-compensados por temperatura, que no requieren corrección. La escala de este aparato expresa % de sólidos solubles (% SS) y mediante fórmulas empíricas se puede calcular los gramos de azúcar por litro (g L<sup>-1</sup>).

En vitivinicultura vulgarmente se expresa grado Brix (° Brix) como equivalente al % SS. Un grado Brix se define como 1 g de sacarosa cada 100 g de solución. Si bien en el jugo de uva los azúcares son los compuestos más abundantes, también se encuentran en solución ácidos, polifenoles, proteínas, minerales, polisacáridos, que intervienen en el índice de refracción. Por esta razón la expresión correcta es sólidos solubles y no ° Brix (apropiado para expresar la concentración de un almíbar, que solo contiene sacarosa y agua).

A partir del contenido de azúcar del jugo de uva, se puede obtener por cálculo los gramos de azúcar por baya. Esto es importante debido a que nos permite identificar el momento de máxima ganancia de azúcar en el fruto. Este momento no coincide con el del máximo de % de ss. En efecto, desde el momento en que no ingresa más azúcar a las bayas, el % de ss sigue aumentando por deshidratación de las mismas. En la figura 2.9, se muestran los valores de % de ss, tamaño de baya y azúcar en función del tiempo de maduración, en un proceso típico de maduración de uvas. Allí se puede observar, en la última etapa, el aumento de % ss por deshidratación sin aumento de la acumulación de azúcares.

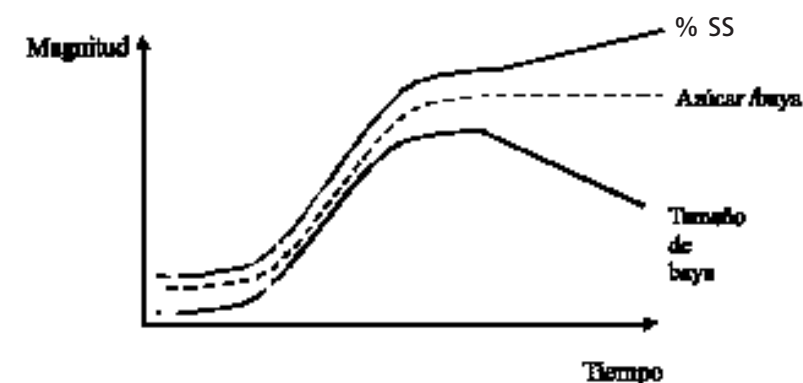


Figura 2.9: Evolución de % sólidos solubles (SS), azúcar/baya, y tamaño de baya durante la maduración de las uvas

### Materiales:

- Refractómetro (figura 2.10)

- Termómetro (en caso de no tener refractómetro compensado por temperatura)
- Agua destilada y papel tissue, para limpieza del refractómetro

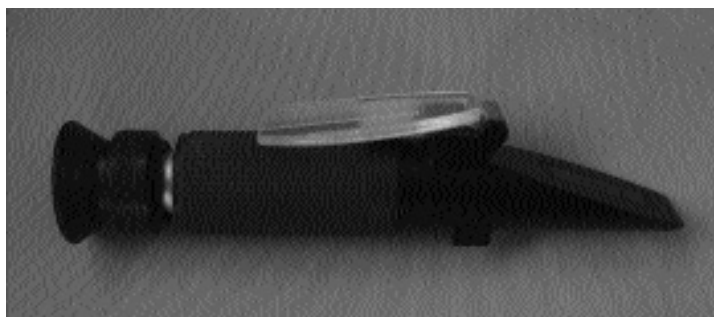
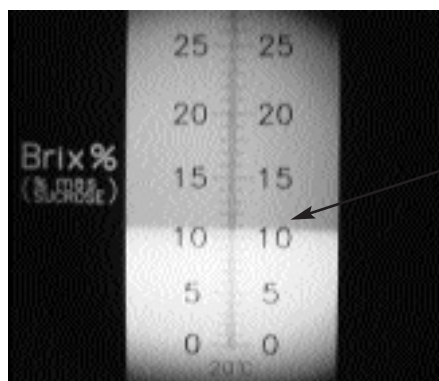


Figura 2.10: Refractómetro

**Método:**

Calibrar el refractómetro a 0 con agua destilada. Prensar una muestra de bayas no inferior a 50 granos y separar el jugo. El prensado debe ser lo más exhaustivo posible ya que la concentración de azúcar en el centro de las bayas es inferior a la de la periferia. Medir la temperatura del jugo en caso de no utilizar refractómetros autocompensados, para corregir el valor en función de la misma. En el refractómetro limpio y seco, se colocan unas gotas de jugo, se cierra y se ve a través de la escala orientando el aparato hacia una fuente de luz y haciendo foco en la escala, mediante el ajuste del ocular. La lectura se realiza como se observa en figura 2.11, obteniendo de esta manera el % de sólidos solubles. Recordar siempre que la limpieza de este aparato debe realizarse con agua destilada y secándolo suavemente con papel tissue.



Lectura 11% SS

Figura 2.11: Lectura realizada en ocular de refractómetro.

**Cálculo de resultados:**

La mayoría de los refractómetros actuales son autocompensados y no necesitan corrección por temperatura, por lo que se considera la lectura directa. Para los no autocompensados, la lectura debe corregirse por la tabla 2.6 para llevar los valores a 20° C.

Tabla 2.6: Correcciones necesarias de % de sólidos solubles (SS), cuando no se realiza a la temperatura de 20° C (para refractómetros no autocompensados)

Temperatura °C	LECTURA EN REFRACTÓMETRO						
	0	5	10	15	20	25	30
	RESTAR AL VALOR LEÍDO						
10	0,500	0,540	0,580	0,610	0,640	0,660	0,680
11	0,460	0,490	0,530	0,550	0,580	0,600	0,620
12	0,420	0,450	0,480	0,500	0,520	0,540	0,560
13	0,370	0,400	0,420	0,440	0,460	0,480	0,490
14	0,330	0,350	0,370	0,390	0,400	0,410	0,420
15	0,270	0,290	0,310	0,330	0,340	0,340	0,350
16	0,220	0,240	0,250	0,260	0,270	0,280	0,280
17	0,170	0,180	0,190	0,200	0,210	0,210	0,210
18	0,120	0,130	0,130	0,140	0,140	0,140	0,140
19	0,060	0,060	0,060	0,070	0,070	0,070	0,070
20	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	SUMAR AL VALOR LEÍDO						
21	0,060	0,070	0,070	0,070	0,070	0,070	0,080
22	0,130	0,130	0,140	0,140	0,150	0,150	0,150
23	0,190	0,200	0,210	0,220	0,220	0,230	0,230
24	0,260	0,270	0,280	0,290	0,300	0,300	0,310
25	0,330	0,350	0,360	0,370	0,380	0,380	0,390
26	0,400	0,420	0,430	0,440	0,450	0,460	0,470
27	0,480	0,500	0,520	0,530	0,540	0,550	0,550
28	0,560	0,570	0,600	0,610	0,620	0,630	0,630
29	0,640	0,660	0,680	0,690	0,710	0,720	0,720
30	0,720	0,740	0,770	0,780	0,790	0,800	0,800

A partir del valor de sólidos solubles, se puede determinar aproximadamente la cantidad de azúcar presente en el mosto utilizando la corrección expresada en la siguiente fórmula empírica (Frigerio, 1986):

$$\text{Azúcar (g L}^{-1}\text{ mosto)} = (11,142 \times \text{Lectura \% SS}) - 27,367$$

Una forma aproximada de conocer la concentración de azúcar en g L<sup>-1</sup>, es multiplicar por 10 la lectura del refractómetro (e.g. 15%, corresponde aproximadamente a 150 g L<sup>-1</sup>).

También se pueden calcular aproximadamente los gramos de azúcar por baya mediante el valor de % de sólidos solubles y el peso medio de baya (ver capítulo 1) como se observa a continuación:

$$\text{Azúcar (g baya}^{-1}\text{)} = \text{Azúcar (g L}^{-1}\text{ mosto)} / (\text{Bayas kg}^{-1}\text{ uva} \times \text{D kg L}^{-1}\text{)}$$

$$\text{D (densidad del mosto de uva kg L}^{-1}\text{)} = [(0,0046 \times \%SS) + 0,9927]$$

$$\text{Bayas kg}^{-1}\text{ uva} = 1000 (\text{g kg}^{-1}) / \text{Peso medio baya (g)}$$

**Ejemplo:**

Lectura: 25 % sólidos solubles (% ss)  
 Temperatura: 22° C  
 Peso baya: 1,7 g  
 Corrección: +0,15  
 Lectura corregida por temperatura: 25% + 0,15% = 25,15 % sólidos solubles  
 Azúcar (g L<sup>-1</sup> mosto): 252,85 g L<sup>-1</sup>  
 Azúcar (g baya<sup>-1</sup>): 0,388 g baya<sup>-1</sup>

En la tabla 2.7 se muestran valores promedios de % de SS obtenidos en muestras de uva recolectadas en el momento de cosecha de distintas variedades en el Laboratorio de Viticultura del INTA Mendoza.

Tabla 2.7: Valores promedios de % de sólidos solubles (SS) obtenidos al momento de cosecha del ciclo 2005-06 y 2006-07, en distintas variedades

Variedad	Cantidad de determinaciones	% SS		
		media	Intervalo	confianza 95%*
Bonarda	15	23,41	22,84	23,99
Cabernet Sauvignon	58	25,24	24,84	25,65
Malbec	379	24,69	24,55	24,83
Merlot	48	25,28	25,02	25,55
Syrah	246	24,68	24,49	24,87

\*El intervalo de confianza indica el rango de valores que puede tomar la media en la población para el nivel de confianza indicado.

**b) DENSIDAD Y GRADO BAUMÉ**

Otra forma de medir sólidos solubles totales en la uva, es mediante la determinación de la densidad del mosto. Esto se puede hacer con aerómetros que miden densidad o grados Baumé. El método se basa en que el aerómetro o densímetro, cuando es sumergido en una probeta con líquido, desplaza un volumen de líquido equivalente a su propio peso (principio de Arquímedes). Es importante tener en cuenta que la medida de la densidad depende de la temperatura.

En enología se expresa la densidad como relativa a la del agua, por lo que es un valor adimensional, y no como densidad absoluta (expresada en g mL<sup>-1</sup>). La densidad de un mosto será más elevada cuanto mayor sea su concentración azucarina. Dado que en mostos o vinos el principal componente es el agua, sus valores de densidad se encuentran muy cercanos a ella. El mosto tiene una densidad levemente superior al agua (e.g. 1,098) debido a la influencia de los azúcares. La densidad del vino, en cambio, es inferior a la del agua (e.g. 0,997) por la presencia de alcohol. Por esta razón, la densidad es útil tanto para evaluar la concentración de azúcar del mosto como para controlar la evolución de la fermentación alcohólica. La lectura de densidad se refiere a 15° C, en caso de trabajar a temperatura diferente la corrección se realiza por medio de tablas

(ver tabla 2.8). Si la temperatura es superior a 15° C, el factor de corrección se suma a la lectura de densidad y si es inferior se resta.

Tabla 2.8: Correcciones necesarias en densidad, cuando no se realiza la lectura a 15° C

Temperatura °C	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Corrección *	0,4	0,3	0,2	0,0	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9	1,1	1,3	1,6	1,8	2,0	2,3	2,6	2,8	3,1

\*Si la temperatura es mayor a 15° C, la corrección se suma a la lectura de densidad. Si la temperatura es inferior a 15° C, la corrección se resta.

La escala Baumé proviene de la industria alimentaria, donde se utilizaba para medir la concentración de la salmuera. Un valor de 0° Bé corresponde al agua destilada y 15° Bé a una solución al 15% de ClNa en agua, por lo tanto es una escala arbitraria. Se usa en enología porque se observó que, cuando se vinificaba un mosto de 10° Bé, se obtenía un vino de aproximadamente 10% (v/v) de alcohol. Por ello, 1° Baumé en el mosto produce aproximadamente 1% (v/v) de alcohol en el vino generado a partir de él. Debido a esto, también se puede establecer la siguiente equivalencia: 1° Bé = 17,5 g azúcar L<sup>-1</sup> (cantidad de azúcar necesaria para que las levaduras produzcan 1% v/v de alcohol). La lectura de ° Bé se refiere a 15° C, y en caso de trabajar a temperatura diferente, debe realizarse una corrección. Cada 2° C por encima de 15° C, se le suma 0,1° Bé a la lectura realizada. Cada 2° C por debajo de 15° C se le resta 0,1° Bé.

**Materiales:**

- Densímetro o aerómetro Baumé
- Termómetro
- Probeta lisa sin graduación (con un diámetro mínimo que permita flotar libremente al densímetro sin tocar las paredes, aproximadamente 3 cm)

**Método:**

Prensar una muestra de bayas no inferior a 50 granos y separar el jugo. El prensado debe ser lo más exhaustivo posible, ya que la concentración de azúcar en el centro de las bayas es inferior a la de la periferia. En probeta limpia y seca, agregar el jugo a medir hasta unas 3/4 partes de la misma. Tomar temperatura del mismo, para luego realizar las correcciones necesarias, si la misma fuera diferente a 15° C. Introducir el densímetro o aerómetro Baumé provocando un pequeño movimiento de rotación. Una vez estable, leer tangencialmente en la parte inferior del menisco. Si bien esta es la manera correcta de efectuar la lectura, no se puede realizar tangente al menisco en los mostos debido a que no son límpidos y se realiza en el borde superior del menisco.

Precaución: debe evitarse la presencia de restos vegetales en suspensión porque podrían depositarse sobre los hombros del densímetro y dar una lectura por defecto. Para evitarlo, se puede llenar la probeta permitiendo rebalsar el jugo, de modo de eliminar por volcado la espuma, hollejos y semillas que se encuentran en la parte superior. Otra forma es emplear los escobajos como filtro de hollejos y semilla; para evitar la formación de espuma volcar lentamente el jugo sobre la pared interna de la probeta.

## 2.6. MEDICIÓN DE pH

La acidez en un jugo de uva se puede evaluar de distintas formas. Aquí se proponen dos. Una es la cuantificación de la acidez total, representada por ácidos disociados o no, y sales ácidas presentes en la muestra (se expresa en g ácido tartárico L<sup>-1</sup>). La otra es el pH, el cual está relacionado con el grado de disociación de los ácidos, reflejado en la cantidad de iones hidrógenos (H<sup>+</sup>) que liberan. Este valor varía para cada ácido presente. Por ejemplo, el ácido tartárico es un ácido más fuerte que el málico y libera mayor cantidad de iones H<sup>+</sup> en solución. El pH es el logaritmo negativo (base 10) de la concentración de H<sup>+</sup>, como se muestra en la siguiente fórmula:

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$$

Esta fórmula nos muestra que, a medida que hay más ácidos disociados o mayor concentración de iones H<sup>+</sup> en la muestra, disminuye su pH.

La medida de este valor en la uva, es muy importante debido a que influye en los aspectos sanitarios y organolépticos del vino. Valores bajos de pH son deseables para una óptima fermentación y conservación de los vinos.

### Materiales:

- Potenciómetro calibrado (peachímetro; figura 2.12)
- Termómetro
- Agua destilada
- Soluciones buffer pH 4 y pH 7 (para calibración)



Figura 2.12: peachímetro

### Método:

Prensar una muestra de bayas no inferior a 50 granos y separar el jugo. El prensado debe ser lo más exhaustivo posible. Calibrar el peachímetro, con las soluciones buffer, teniendo la precaución de enjuagar bien el electrodo con agua destilada y secarlo con papel tissue por fuera. Posteriormente se introduce el electrodo en el jugo a medir, el cual debe estar a una temperatura de 20° C. Si la lectura no se realiza a esta temperatura debe corregirse el valor, observando las tablas de corrección del peachímetro, en caso de que el mismo no sea autocompensado por temperatura.

### Interpretación de resultados:

El valor se obtiene por lectura directa en el visor del peachímetro. Este análisis debe realizarse en uvas frescas. Si se realiza en muestras congeladas puede aplicarse la siguiente corrección, debida a precipitaciones de tártaro (tartrato ácido de potasio) por bajas temperaturas (figura 2.13):

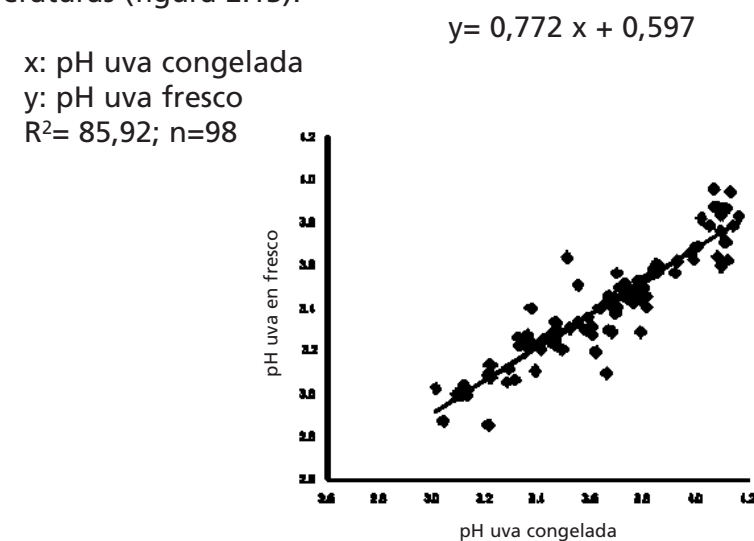


Figura 2.13: Gráfico de pH uva congelada (x) vs. pH uva en fresco (y)

En la tabla 2.9 se presentan, a modo ilustrativo, valores medios de pH e intervalos de confianza de muestras de uva a cosecha de distintas variedades, obtenidas en el Laboratorio de Viticultura (INTA).

Tabla 2.9: Valores promedios de pH (uva fresco) obtenidos al momento de cosecha en el ciclo 2005-06 y 2006-07, en distintas variedades

Variedad	Cantidad de determinaciones	pH		
		Media	Intervalo confianza 95%*	
Bonarda	15	3,82	3,79	3,85
Cabernet Sauvignon	58	3,72	3,69	3,75
Malbec	379	3,58	3,56	3,60
Merlot	48	3,73	3,71	3,75
Syrah	246	3,69	3,67	3,72

\*El intervalo de confianza indica el rango de valores que puede tomar la media en la población para el nivel de confianza indicado.

## 2.7. ACIDEZ TOTAL TITULABLE

La acidez total es la suma de los ácidos volátiles y fijos, valorables por alcalimetría-acidimetría. El jugo de uva es más ácido que el vino que origina, ya que durante la fermentación y la conservación del vino, una cierta cantidad de tartrato ácido de potasio se insolubiliza y precipita. Esto produce una pérdida de acidez. La fermentación maloláctica también reduce la acidez total del vino. La zona, la variedad, el manejo de canopia, la fecha de cosecha, la presencia o no de algunas enfermedades, provocan una variación de los valores de acidez. El método de determinación es una volumetría líquida, es decir una titulación con una solución alcalina de normalidad conocida, usando como indicador fenoftaleína o azul de bromotimol.

### Materiales:

- Pipeta de doble aforo de 10 mL
- Erlenmeyer 250 mL
- Bureta de 25 mL + Soporte
- Reactivos:
  - a) Solución de Hidróxido de sodio (NaOH) N/10
  - b) Indicador fenoftaleína (para mostos blancos) o azul de bromotimol (para mostos blancos y coloreados)

### Método:

Prensar una muestra de bayas, no inferior a 50 granos, y separar el jugo. El prensado debe ser lo más exhaustivo posible. Tomar 10 mL de mosto con pipeta de doble aforo y colocarlo en un erlenmeyer. Agregar aproximadamente 50 mL de agua destilada y 2 ó 3 gotas del indicador elegido (fenoftaleína o azul de bromotimol). Si el mosto es coloreado, es preferible usar azul de bromotimol, ya que no se puede apreciar el viraje de la fenolftaleína. Llenar y enrasar la bureta con la solución de NaOH N/10. Titular hasta viraje del indicador, registrando el volumen utilizado de NaOH N/10. En el caso de usar fenoftaleína, se agrega esta solución hasta viraje del incoloro (medio ácido) al rosado (en medio alcalino). Si se utiliza como indicador azul de bromotimol, vira de un color amarillo anaranjado en medio ácido a un color verde azulado. Cerca del viraje, se va agregando de a 2 gotas el NaOH, si pasa a color azul, se le resta 0,1 mL a la lectura efectuada.

### Cálculo de resultados:

A partir de la siguiente fórmula, se calcula la acidez como ácido tartárico:

$$\text{Acidez total (g ácido tartárico L}^{-1}\text{)} = [\text{Gasto mL NaOH N/10} \times 0,75]$$

### Preparación de soluciones:

*Solución de NaOH N/10:*

Una solución N/10 ó 0,1 N, se debe preparar con 0,1 equivalente por litro de HONa. El

equivalente del HONa pesa 40,01 g, por lo tanto la décima parte es 4,001 g. Para preparar esta solución se debe pesar 4,001 g de HONa para análisis (p.a.) en balanza analítica. Trasvasar en forma cuantitativa a un vaso de precipitación de 1000 mL que contiene unos 500 mL de agua destilada, revolviendo para su disolución con una varilla de vidrio. Tener en cuenta que es una reacción exotérmica. Una vez que se enfríe, trasvasar al matraz de 1000 mL y enrasar con agua destilada. Esta solución debe valorarse para calcular el factor de corrección mediante el uso de CIH 0,1N.

Advertencia: esta solución debe conservarse en frascos tapados ya que reacciona con el dióxido de carbono del aire y ser titulada con frecuencia para el control de su normalidad (determinando el factor de corrección).

### Precauciones en la manipulación:

*Hidróxido de sodio (NaOH):* es corrosivo, produce quemaduras severas. Manejar con guantes y proteger los ojos.



## 2.8. ANTOCIANOS TOTALES EN HOLLEJOS, A PARTIR DE MÉTODO RIOU-ASSELIN

Para la determinación de antocianos totales, se utiliza la técnica generada por el Laboratorio de Viticultura a partir de Riou y Asselin, 1996. En ésta se realiza una maceración de los hollejos con una solución hidroalcohólica (solución de extracción de Angers: etanol 12%, SO<sub>2</sub> 100 mg L<sup>-1</sup>, pH 3,5) en caliente (70° C) durante 3 horas. Al líquido obtenido por extracción, se le agrega ácido clorhídrico sólo para generar un pH fuertemente ácido y transformar la totalidad de los antocianos monómeros, a la forma roja flavilium. Este pigmento rojo se mide con espectrofotómetro de luz visible a una longitud de onda de 520 nm.

### Materiales:

- Espectrofotómetro de luz visible, las lecturas se realizarán a 520 nm de longitud de onda
- Balanza de precisión
- Cubetas de vidrio de 1 cm de paso óptico
- Tubo de ensayo con tapa a rosca, de aproximadamente 15 mL
- Pipeta de doble aforo de 10 mL
- Micropipeta de 10-1000 µL
- Matraz de 5 ó 10 mL
- Reactivos:
  - a) Ácido ClH 1%
  - b) Ácido ClH 2%
  - c) Solución de extracción de Angers

### Método:

Blanco: lectura con agua destilada en cubeta del espectrofotómetro de 1 cm de paso óptico.

Pesar en balanza de precisión aproximadamente 10 gramos de bayas enteras de la clase modal, anotar el valor exacto del peso ("P") y contar la cantidad de bayas correspondiente. Registrar estos datos. El hollejo separado de estas bayas (ver capítulo 2.4 "Determinación de las relaciones hollejo/baya y semilla/baya") se debe colocar en tubo de ensayo con tapa a rosca, identificándolo con el número de muestra. Agregar 10 mL de solución de extracción de Angers, medido con pipeta de doble aforo, y tapar el tubo. Llevar a baño maría a 70° C durante 3 horas.

Una vez transcurrido este tiempo, retirar el tubo y enfriarlo rápidamente. Al líquido sobrenadante diluirlo 1:100 con ClH 1%. Esta dilución se realiza en matraz de 5 mL ó 10 mL. En caso de usar el de 5 mL, colocar 50 µL de extracto y enrasar el matraz con ClH 1%. Esta solución diluida es trasvasada a la cubeta de 1 cm de paso óptico. Leer y registrar valores de absorbancia en espectrofotómetro de luz visible, a una longitud de onda de 520 nm, llevando el aparato a cero con el blanco.

### Cálculo de resultados:

La concentración de antocianos de la solución evaluada en cubeta (extracto de hollejo

diluido), se calcula a partir de la siguiente fórmula definida en trabajo de Riou y Asselin (1996).

$$\text{Antocianos (mg L}^{-1}\text{)} = [22,76 \times \text{DO}_{520} \times \text{Dilución}] + 0,05$$

DO<sub>520</sub>: Lectura de densidad óptica

Dilución: es de 1:100, es decir el valor a colocar en formula es 100

Para determinar los valores de antocianos en mg kg uva<sup>-1</sup> o en mg baya<sup>-1</sup>, utilizamos las siguientes fórmulas:

$$\text{Antocianos mg kg uva}^{-1} = \frac{\text{Antocianos en mg L}^{-1} \times \text{Volumen extractante (10mL)}}{\text{"P" (peso muestra, g)}}$$

$$\text{Antocianos mg baya}^{-1} = \text{Antocianos mg kg uva}^{-1} \times \underbrace{\text{Peso medio baya (g) / 1000}}_{\text{Inversa relación bayas kg}^{-1} \text{ uva}}$$

En la tabla 2.10 y 2.11 se indican valores medios de antocianos e intervalos de confianza, de uvas a cosecha de distintas variedades, obtenidos por el Laboratorio de Viticultura del INTA Mendoza

Tabla 2.10: Contenidos de antocianos en mg kg uva<sup>-1</sup> en distintas variedades (cosechas 2005-06 y 2006-07)

Variedad	Cantidad de determinaciones	Antocianos mg kg uva <sup>-1</sup>		
		Media	Intervalo confianza 95%*	
Bonarda	15	1374	1 273	1474
Cabernet Sauvignon	58	836	748	924
Malbec	379	1061	1022	1099
Merlot	48	457	436	479
Syrah	246	738	716	759

\* El intervalo de confianza indica el rango de valores que puede tomar la media en la población para el nivel de confianza indicado.

Tabla 2.11: Contenidos de antocianos en mg baya<sup>-1</sup> en distintas variedades (cosechas 2005-06 y 2006-07)

Variedad	Cantidad de determinaciones	Antocianos mg baya <sup>-1</sup>		
		media	Intervalo confianza 95%*	
Bonarda	15	3,60	3,28	3,91
Cabernet Sauvignon	58	1,02	0,91	1,13
Malbec	379	1,79	1,72	1,85
Merlot	48	0,61	0,58	0,64
Syrah	246	1,11	1,07	1,14

\*El intervalo de confianza indica el rango de valores que puede tomar la media en la población para el nivel de confianza indicado.

**Preparación de soluciones:***Solución de extracción de Angers:*

Preparar una solución de etanol al 12%, colocando en un matraz de 500 mL, 60 mL de etanol p.a. y enrasar con agua destilada.

Para obtener 100 mg L<sup>-1</sup> de SO<sub>2</sub>, pesar 85,5 mg de metabisulfito de sodio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) y trasvasar cuantitativamente a un matraz de 500 mL. Llevar a volumen y enrasar el matraz con la solución de etanol al 12% anteriormente preparada. Agregar a esta solución suficiente cantidad de tartrato ácido de potasio, hasta saturación. Llevar la solución a pH 3,5 con una solución de ácido clorhídrico al 2%.

Para preparar otros volúmenes de solución ver tabla 2.12

Tabla 2.12: Cantidades a agregar para preparar distintos volúmenes de solución de Angers

Volumen a preparar (mL)	Agua (mL)	Etanol (mL)	Metabisulfito de Na (mg)
200	176	24	34,188
250	240	30	42,735
500	440	60	85,470

Precaución: Tener en cuenta que el metabisulfito de sodio debe conservarse en lugares frescos y además con el tiempo pierde por volatilización SO<sub>2</sub>. Por esta razón es conveniente usar drogas nuevas y no almacenarlas por largos períodos. Nunca calentar esta solución para mejorar disolución porque el sulfuroso es volátil y se pierde concentración.

*CIH 1% p/v (en peso):*

Para preparar 100 mL de esta solución se debe tener en cuenta la densidad del CIH (1,18 g mL<sup>-1</sup>) y su pureza o concentración (37%). Un gramo de CIH necesario para preparar esta solución al 1%, se encuentra en 2,3 mL de CIH con una pureza del 37%, como se observa en los cálculos presentados a continuación.

Si 1,18 g de CIH ————— se encuentran en 1 mL  
 1,0 g de CIH ————— X = (1,0 g x 1 mL) / 1,18 g = 0,85 mL

Si tuviera una pureza de 100% ————— necesitaríamos 0,85 mL de CIH  
 Como tiene pureza de 37% ————— necesitamos 2,3 mL de CIH 37%

**2.9. POLIFENOLES TOTALES EN HOLLEJOS, A PARTIR DE MÉTODO RIOU-ASSELIN**

La técnica de determinación de polifenoles totales de Riou and Asselin (1996) se basa en la actividad óptica específica del anillo fenólico en el sector ultravioleta del espectro. Se utiliza el extracto de los hollejos realizado para la determinación de antocianos (capítulo 2.8) en el cual se macera los hollejos con una solución hidroalcohólica (etanol 12%, SO<sub>2</sub> 100 mg L<sup>-1</sup>, pH 3,5) en caliente (70° C) durante 3 horas. A partir de una porción del extracto se diluye con agua destilada y se mide con espectrofotómetro UV.

**Materiales:**

- Espectrofotómetro que opere en luz UV, las lecturas se realizarán a 280 nm de longitud de onda.
- Cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico
- Extracto de hollejo con solución Angers (obtenido en capítulo 2.8)
- Micropipeta automática de 100 a 1000 µL
- Matraz 5 mL (puede ser remplazado con el uso de micropipeta)

**Método:**

*Blanco:* lectura con agua destilada en cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

A partir del extracto de hollejo realizado en la determinación de antocianos totales (capítulo 2.8) realizar una dilución 1:100 de extracto con agua destilada usando un matraz aforado de 5 mL. Para lo cual se miden con micropipeta automática 50 µL de muestra, se vuelcan en un matraz de 5 mL y se enrasa con agua destilada.

Prender el espectrofotómetro UV-VIS a 280 nm, 30 minutos antes de la lectura para estabilizar la lámpara de deuterio<sup>8</sup>. Leer en espectrofotómetro colocando la muestra diluida en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, llevando el aparato a cero con el blanco.

**Cálculo de resultado:**

$IPT_{hollejo} = (DO_{280} \times Dilución)$

Dilución: 100

En tabla 2.13 se indican valores medios e intervalos de confianza de IPT en hollejos de uva a cosecha de distintas variedades, obtenidos por el Laboratorio de Viticultura del INTA Mendoza.

<sup>8</sup> Las lámparas de Xenon para medición a 280 nm en general no necesitan ser precalentadas antes de la lectura.

Tabla 2.13: Valores de IPT en hollejos (extracto Angers) en distintas variedades (cosechas 2005-06 y 2006-07)

Variedad	Cantidad de determinaciones	IPT		
		Media	Intervalo confianza 95%*	
Bonarda	15	65	61	69
Cabernet Sauvignon	58	45	42	49
Malbec	379	59	58	61
Merlot	48	33	32	34
Syrah	246	45	43	46

\*El intervalo de confianza indica el rango de valores que puede tomar la media en la población para el nivel de confianza indicado.

## 2.10. ANTOCIANOS TOTALES EN MUESTRAS DE UVA (HOLLEJO Y SEMILLA) A PARTIR DE MÉTODO GLORIES

Otro método para estudiar el potencial polifenólico en uvas, es el propuesto por Glories y Agustin (Glories, 1999). Se puede seguir el protocolo que para este método elaboró González Neves (2005; 2007). Primero, se realiza la trituración de la muestra de uva entera (semillas, pulpa y hollejos) para luego realizar sendas maceraciones con soluciones a pH diferente (pH 1 y pH 3,2). La extracción a pH 1 degrada las membranas celulares y favorece la liberación del contenido de las vacuolas. La extracción a pH 3,2 es comparable con la que se realiza en una vinificación. La diferencia entre el contenido de antocianos a ambos pH, muestra el grado de fragilidad de las membranas de las células de los hollejos y por lo tanto su estado de madurez. En las maceraciones a estos dos pH, luego de ser filtradas y centrifugadas, se realiza medición de antocianos totales por el método de Ribereau-Gayón and Stonestreet (1965), utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm. En el extracto macerado a pH 3,2 también puede hacerse una medición en espectrofotómetro a 280 nm, por medio de la cual se determina el índice de polifenoles totales (capítulo 2.11).

En este método, como se observa en diagrama presentado en figura 2.14, la muestra se divide en dos submuestras; una se tritura y la otra se prensa manualmente. Esta última es para determinaciones de % de sólidos solubles, pH, acidez en el jugo y determinación por pesos de % de pulpa y de semilla + hollejo.

### 2.10.a PREPARACIÓN DE MACERACIONES pH 1 y pH 3,2

#### Materiales:

- Balanza de precisión
- Agitador orbital o rotativo para maceración
- Centrifuga
- Mixer o licuadora
- Erlenmeyer (250 mL)
- Portafiltro con papel de filtro
- Reactivos:
  - a) Solución pH 1- CIH 0,1N
  - b) Solución pH 3,2

#### Método:

A una muestra de uva representativa de la parcela (125 bayas), se la debe triturar con ayuda de un mixer o licuadora (hollejo, semilla y pulpa). En dos erlenmeyers colocar 50 g de esta muestra triturada en cada uno de ellos. A uno se le agrega 50 mL de solución pH 1 (CIH 0,1N), y al otro 50 mL de solución pH 3,2. Ambos son llevados a un agitador orbital por un tiempo de 4 horas. Posteriormente estos macerados son filtrados con papel de filtro y centrifugados 3 minutos a 3000 rpm.

### 2.10.b DETERMINACIÓN DE ANTOCIANOS TOTALES EN MACERACIONES pH 1 Y pH 3,2; POR METODO RIBEREAU-GAYON Y STONESTREET

Para la determinación de antocianinas totales en los macerados de pH 1 y 3,2 se utiliza el blanqueo con bisulfito de sodio ( $\text{SO}_3\text{HNa}$ ) por acción del dióxido de azufre (Ribéreau-Gayon y Stonestreet, 1965). Es decir, se hace un análisis de antocianos para el macerado de pH 1 y otro para el de pH 3,2.

El método Ribéreau-Gayon y Stonestreet se basa en que los cambios de pH producen grandes cambios en el color de los pigmentos antociánicos. De modo similar, las adiciones de dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ) producen decoloración de los pigmentos monoméricos, mientras que los pigmentos poliméricos son resistentes a dicha decoloración. La diferencia entre los valores de absorbancia correspondientes a la muestra tratada con y sin  $\text{SO}_2$  provee una medida del contenido de antocianos coloreados (forma flavilium). Cuanto mayor es la diferencia de color, mayor es la concentración de antocianos.

En esta determinación, la muestra se lleva a un medio fuertemente ácido para que los antocianos se manifiesten en su forma coloreada. Con el agregado del bisulfito de sodio se blanquean los antocianos no polimerizados, los que luego son estimados, deduciéndolos de la medición de color rojo de una muestra de jugo no sometida a blanqueo.

#### Materiales:

- Espectrofotómetro de luz visible (Longitud de onda para lectura: 520 nm)
- Cubetas de vidrio de 1 cm de paso óptico, para espectrofotómetro
- Micropipetas automáticas ( 200  $\mu\text{L}$ , 1000  $\mu\text{L}$  y 5000  $\mu\text{L}$  de volumen máximo)
- Tubos de ensayo con tapa de 5 mL
- Reactivos:
  - a) Solución de ClH 0,1% en etanol
  - b) Solución de ClH 2% en agua
  - c) Sulfito ácido de sodio o bisulfito de sodio 15% ( $\text{SO}_3\text{HNa}$ )

#### Método:

Blanco:

Asignamos el cero del espectrofotómetro con agua destilada para este método.

Muestra:

Tomar 200  $\mu\text{L}$  de la maceración (pH 1 o pH 3,2) y colocarlos en un tubo de ensayo. Agregar 200  $\mu\text{L}$  de ClH 0,1% en etanol y 4 mL de ClH 2% en agua. Tapar y homogeneizar el contenido.

Esta solución se divide en dos partes, una de las cuales será blanqueada con bisulfito de sodio ( $\text{SO}_3\text{HNa}$ ), y la otra no. Se procede así: tomar dos tubos de ensayo de 5 mL, en uno de ellos (tubo A) agregar 2 mL de la solución anterior, agregar 800  $\mu\text{L}$  de solución de

bisulfito de sodio al 15%, homogeneizar y dejar reposar 20 minutos. Leer en espectrofotómetro a 520 nm de longitud de onda. En el otro tubo (tubo B), agregar 2 mL de la solución y 800  $\mu\text{L}$  de agua destilada (reemplazando el bisulfito de sodio), homogeneizar y leer inmediatamente en espectrofotómetro a la misma longitud de onda. El aparato se lleva a cero con el blanco indicado más arriba.

#### Cálculo de resultados:

Los valores de antocianos del extracto utilizando el método de Ribéreau-Gayon y Stonestreet, se calculan a partir de la fórmula presentada a continuación:

$$\text{Antocianos (mg L}^{-1}\text{ extracto macerado)} = [\text{Lectura TuboA} - \text{Lectura TuboB}] \times 875$$

Con los valores de antocianos y las medidas de % de pulpa, densidad y factores de dilución del jugo de uva, se pueden calcular los antocianos por litro de jugo de uva mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Antocianos (mg L}^{-1}\text{ jugo uva)} = \text{Antocianos (mg L}^{-1}\text{ extracto macerado)} \times F$$

F: factor de dilución

$$F (\text{factor de dilución}) = \frac{[50 (\text{mL de sol pH1 ó pH 3,2}) + \text{VM}]}{\text{VM}}$$

VM: volumen del mosto (el mismo se debe calcular ya que se utilizaron 50 g de muestra)

$$\text{VM (volumen de mosto, mL)} = \frac{[50 (\text{g.uva triturada}) \times \% \text{PULPA}]}{D}$$

D: densidad del mosto. Es calculada a partir de % de sólidos solubles medidos con refractómetro.

$$D = [0,0046 \times \% \text{sólidos solubles}] + 0,9927$$

$$\% \text{PULPA} = \frac{[\text{Peso bayas (g)} - \text{Peso hollejos y semillas (g)}] \times 100}{\text{Peso bayas (g)}}$$

$$\% \text{HOLLEJO Y SEMILLA} = \frac{[\text{Peso hollejos y semillas (g)} \times 100]}{\text{Peso bayas (g)}}$$

A partir de estos valores Glories propone el cálculo de los siguientes índices presentados a continuación:

a) Índice de extractibilidad de antocianos ( $E_A$ )

$$E_A(\text{extrabilidad de antocianos}) = ((A1 - A_{3,2}) / A1) \times 100$$

A1: Antocianos  $\text{mg L}^{-1}$  en maceración a pH 1A3,2: Antocianos  $\text{mg L}^{-1}$  en maceración a pH 3,2

## b) Índice de polifenoles totales (IPT), intensidad colorante (IC), y tonalidad en maceraciones a pH 3,2

$$\text{IPT} = \text{DO}_{280} * 100 \text{ (dilución)}$$

$$\text{IC} = \text{DO}_{420} + \text{DO}_{520} + \text{DO}_{620}$$

$$\text{Tonalidad} = \frac{\text{DO}_{420}}{\text{DO}_{520}}$$

**Preparación de soluciones:***Solución de pH 1- ClH 0,1N:*

Una solución N/10 ó 0,1 N, se debe preparar con 0,1 equivalente por litro de ClH. El equivalente del ClH pesa 36,46 g, por lo tanto la décima parte es 3,646 g. Para preparar esta solución, como es un líquido con una pureza del 37% y una densidad de 1,18  $\text{g mL}^{-1}$ , se debe medir un volumen tal que contenga los 3,646 g de ClH puro. Este volumen corresponde a 8,3 mL, como se calcula a continuación:

Si 1,18 g de ClH \_\_\_\_\_ se encuentran en 1 mL  
 3,646 g de ClH \_\_\_\_\_  $X = (3,646 \text{ g} \times 1 \text{ mL}) / 1,18 \text{ g} = 3,0898 \text{ mL}$

Si la pureza fuera de 100% \_\_\_\_\_ necesitaríamos 3,0898 mL de ClH  
 Con pureza de 37% \_\_\_\_\_ necesitamos 8,3509 mL de ClH 37%

Estos 8,3 mL de ClH comercial 37% se deben medir con pipeta mediante el uso de propipeta (no se debe pipetear directamente), agregarlo en un matraz aforado de 1000 mL. Enrasar el matraz con agua destilada, tapar y homogeneizar.

*Solución de pH 3,2*

Pesar 5 g de ácido tartárico. Trasvasar en forma cuantitativa a un vaso de precipitación agregando agua destilada y revolver para su disolución, con una varilla de vidrio. Lue-

go trasvasar a un matraz de 1000 mL, agregar 2,5 mL de HONa 32% (\*) y enrasar con agua destilada.

(\*) Para preparar la solución de HONa 32%, se debe pesar 32 g de HONa. Trasvasar en forma cuantitativa a un vaso de precipitación, agregar agua destilada y revolver para su disolución con una varilla de vidrio. Tener en cuenta que es una reacción exotérmica. Una vez que se enfríe trasvasar cuantitativamente al matraz de 100 mL y enrasar con agua destilada.

*Solución de ClH 0,1% p/v en etanol:*

Medir 0,057 mL de ClH comercial 37% con micropipeta automática, agregarlo en un matraz aforado de 25 mL. Enrasar el matraz con etanol absoluto p.a., tapar y homogeneizar.

Nota: Para preparar esta solución, se debe tener en cuenta la densidad del ácido ClH ( $1,18 \text{ g mL}^{-1}$ ) y la pureza del mismo (37%). Es decir para preparar 25 mL de esta solución al 0,1% (en un matraz), se debe agregar 0,025 g de ácido clorhídrico puro, teniendo en cuenta su pureza y densidad esto corresponde a 0,057 mL de ClH comercial 37% (ó 0,0675 g).

Para preparar otros volúmenes de esta solución utilizar tabla 2.14.

Tabla 2.14: Cantidades a agregar para preparar otros volúmenes de ClH 0,1%

Volumen a preparar ( matraz) (mL)	Volumen a agregar de ClH 37% (mL)
25	0,057
50	0,115
200	0,458

*Solución de ClH 2% p/v en agua:*

Medir 1,145 mL de ClH comercial 37% con micropipeta automática, agregarlo en un matraz aforado de 25 mL. Enrasar el matraz con agua destilada, tapar y homogeneizar. Para preparar otros volúmenes de esta solución utilizar tabla 2.15.

Tabla 2.15: Cantidades a agregar para preparar diferentes volúmenes de ClH 2%

Volumen a preparar ( matraz) (mL)	Bisulfito de sodio a agregar (g)
25	1,145
50	2,290
200	9,162

**Solución de Bisulfito de sodio 15% (SO<sub>3</sub>HNa)**

Pesar 15 g de bisulfito de sodio. Trasvasar en forma cuantitativa a un vaso de precipitación y disolverlo con una pequeña cantidad de agua destilada, agitando con varilla de vidrio. Luego trasvasar este líquido en forma cuantitativa a un matraz de 100 mL (volcando al matraz los dos o tres enjuagues del vaso) y enrasarlo con agua destilada. Para preparar otros volúmenes de esta solución utilizar tabla 2.16.

Tabla 2.16: Cantidades a agregar para preparar diferentes volúmenes de SO<sub>3</sub>HNa al 15%

Volumen a preparar ( matraz) (mL)	Bisulfito de sodio a agregar (g)
25	3,75
50	7,50
200	30,00

**Precauciones en la manipulación:**

**Acido clorhídrico (ClH):** debe trabajarse bajo campana debido a su alta tensión de vapor y evitar contacto con la piel ya que es sumamente corrosivo (con guantes de látex). Nunca pipetear directamente, sino utilizar propipeta.

**Bisulfito de sodio (SO<sub>3</sub>HNa):** es irritante para piel y ojos. Debe conservarse en lugares fríos. Desprende gases tóxicos, sobre todo en contacto con ácidos.

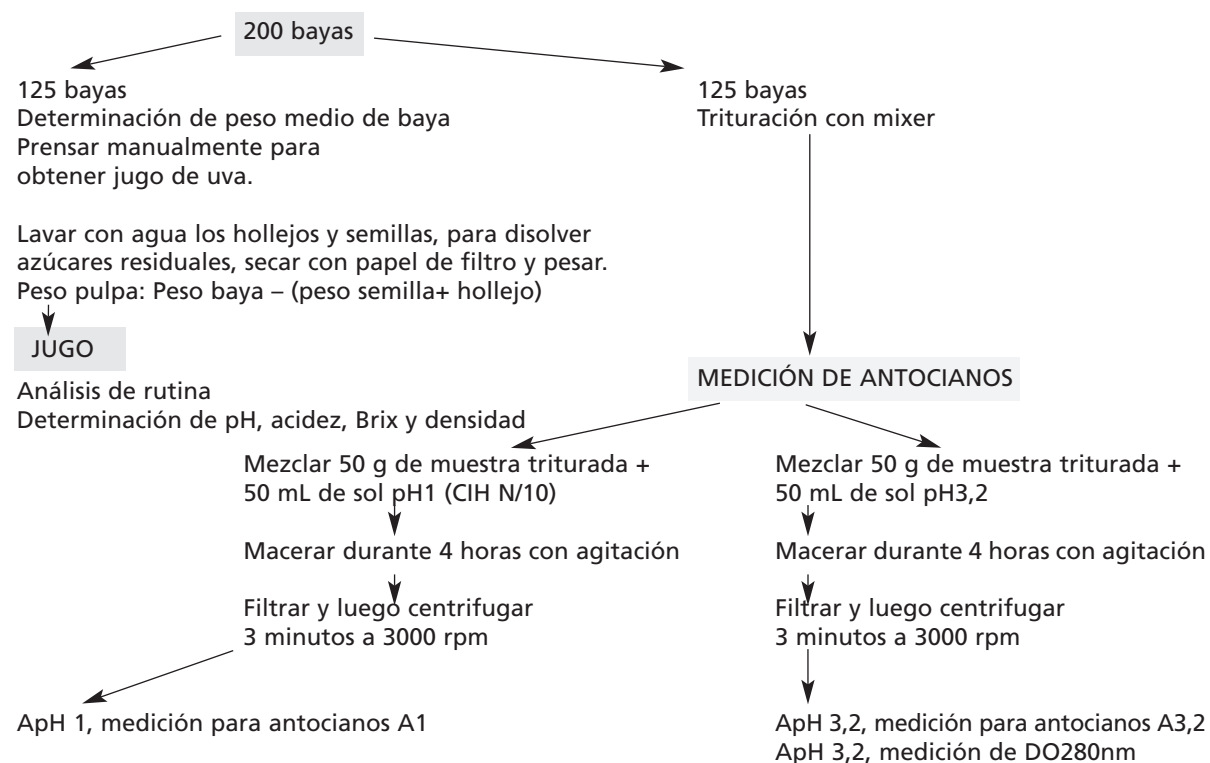


Figura 2.14: Esquema método Glories

**2.11. POLIFENOLES TOTALES EN MUESTRAS TRITURADAS DE HOLLEJO Y SEMILLA, A PARTIR DE MÉTODO GLORIES**

Esta determinación se realiza sobre el extracto macerado a pH 3,2 del método de Glories (capítulo 2.10) basado en la actividad óptica específica del anillo fenólico en el sector ultravioleta del espectro. Al extracto (pH 3,2), se le realiza una dilución 1:100 antes de la lectura en espectrofotómetro (UV) a una longitud de onda de 280 nm, en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Los polifenoles totales se estiman como índice de polifenoles totales (IPT).

**Materiales:**

- Espectrofotómetro que opere en luz UV, las lecturas se realizarán a 280 nm de longitud de onda
- Cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico
- Extracto macerado a pH 3,2 del método Glories (obtenido en capítulo 2.10.a (Preparación de maceraciones pH1 y pH 3,2)
- Micropipeta automática de 100 a 1000 µL
- Matraz 5 mL (puede ser remplazado con el uso de micropipeta)

**Método:****Blanco:**

Lectura con agua destilada en cubeta del espectrofotómetro de 1 cm de paso óptico.

**Muestra:**

A partir del extracto macerado a pH 3,2 del método Glories. Realizar una dilución 1:100 del mismo con agua destilada usando un matraz aforado de 5 mL. Para lo cual se miden con micropipeta automática 50 µL de muestra, se vuelcan en un matraz de 5 mL y se enrasa con agua destilada.

Prender el espectrofotómetro UV-VIS a 280 nm, 30 minutos antes de la lectura para estabilizar la lámpara de deuterio<sup>9</sup>. Leer en espectrofotómetro colocando la muestra diluida en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, llevando el aparato a cero con el blanco.

**Cálculo de resultado:**

$$\text{IPT hollejo} = (DO_{280} \times \text{Dilución})$$

Dilución: 100

<sup>9</sup>Las lámparas de Xenon para medición a 280 nm en general no necesitan ser precalentadas antes de la lectura.

## 2.12. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS PARA DETERMINACIÓN DE TANINOS Y CATEQUINAS EN HOLLEJOS Y DE TANINOS, CATEQUINAS Y FENOLES TOTALES EN SEMILLAS

Para la determinación de los distintos compuestos fenólicos, éstos deben ser extraídos del hollejo y semillas de las uvas de la clase modal. Las uvas de la clase modal se obtienen como se indica en el capítulo 2.2. Con esta clase también se calculan las relaciones hollejo/uva y semilla/uva como se indica en capítulo 2.4. A partir de los hollejos y semillas se realiza la extracción mediante el uso de solventes como acetona 70% para determinación de catequinas y acetona-metanol (50%-50%) para taninos. La metodología usada es la propuesta por (Ojeda, 1999) y adaptada por el Laboratorio de polifenoles INTA-EEA Mendoza.

### Materiales:

- Balanza analítica de precisión (0,1 mg)
- Agitador de plataforma rotativo (figura 2.15)
- Baño ultrasónico (figura 2.15)
- Centrífuga para microtubos (10000 rpm ó 7,2 g de aceleración) (figura 2.15)
- Moledora para semillas (figura 2.16)
- Micropipetas automáticas 100-1000  $\mu\text{L}$ , 1000 a 5000  $\mu\text{L}$  (figura 2.15)
- Microtubos plásticos con tapa de 2 mL (figura 2.15)
- Mortero y pilón
- Termo de nitrógeno líquido
- Reactivos:
  - a) Solución de acetona 70%
  - b) Solución 50% de acetona (80%) más 50% metanol (80%)

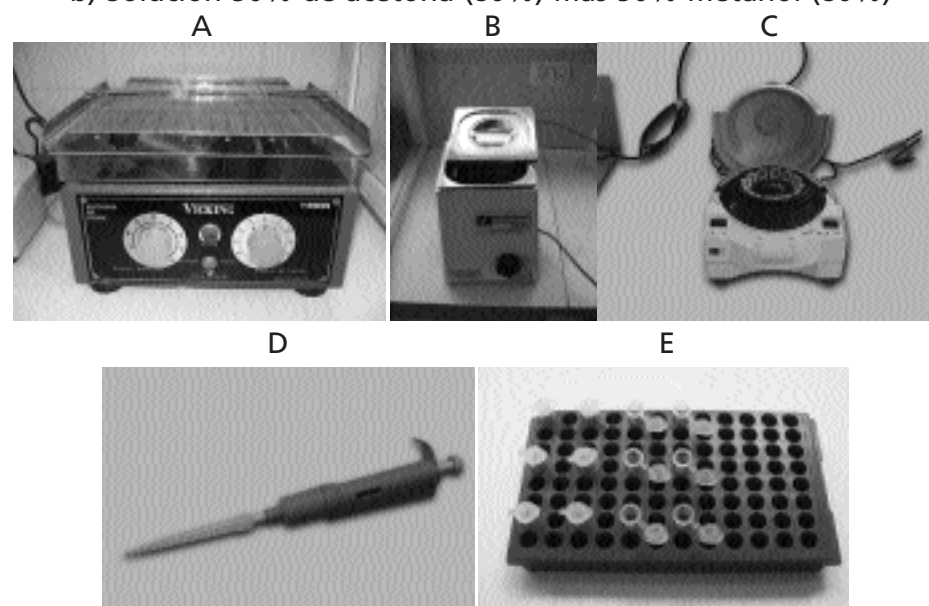


Figura 2.15: Agitador de plataforma rotativo (A), baño ultrasónico (B), centrífuga para microtubos (C), micropipeta automática de 1000 a 5000  $\mu\text{L}$  (D), gradilla con microtubos plásticos con tapa, de 2 mL (E)

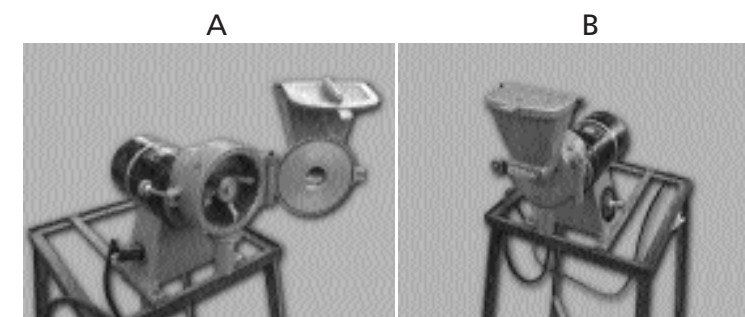


Figura 2.16: Molinillo para molienda de semilla abierto para observar parte interna (A), molinillo de semilla cerrado listo para funcionar (B)

### Método:

#### Para hollejos:

Los hollejos separados de las bayas (ver apartado 2.4) son colocados en mortero donde se muele hasta obtener un polvo, con la ayuda de nitrógeno líquido (Ojeda, 1999). Pesar rápidamente para que no se descongele 30 a 40 mg de este polvo en un microtubo plástico de 2 mL previamente tarado. Este valor pesado en mg debe quedar registrado en planillas para las posteriores determinaciones de taninos y catequinas en uva. A cada microtubo identificado, se le agrega la solución extractante (1,5 mL) en función de la determinación a realizar posteriormente. Para los análisis de catequinas se usa una solución de acetona al 70% v/v y para taninos una solución 50% de acetona (80%) + 50% metanol (80%; Tabla 2.17).

Tabla 2.17: Tipo de solvente y volumen usado en diferentes extracciones de polifenoles

Tipo análisis	Solución extractante	Volumen de extractante (mL)
Catequinas	Acetona 70% v/v	1,5
Taninos IPT de semillas	Sol 50% v/v de Acetona 80% + 50% metanol 80%	1,5

Los microtubos con el polvo de hollejo y el extractante son llevados 15 minutos al agitador de plataforma rotativo, luego 30 minutos al baño ultrasónico, y finalmente 10 minutos a centrífuga a 10000 rpm (equivalente a 7,2 g de aceleración). El líquido sobrenadante, se extrae de los tubos y se coloca en nuevos microtubos limpios correctamente identificados para las posteriores determinaciones analíticas.

#### Para semillas:

Las semillas obtenidas como se indica en el capítulo 2.4, se muelen en un molinillo de paletas (figura 2.16) usando un tamiz de 1 mm hasta obtener una molienda gruesa como se observa en figura 2.17.



Figura 2.17: Granulometría observada luego de la molienda de las semillas de la clase modal

Pesar entre 25 a 30 mg de semillas molidas en un microtubo plástico de 2 mL previamente tarado. Este valor pesado en mg debe quedar registrado en planillas para las posteriores determinaciones de taninos, catequinas e IPT en semilla. A cada microtubo identificado, se le agrega la solución extractante adecuada (1,5 mL) según la determinación a realizar posteriormente (tabla 2.17). Todos los microtubos son llevados 15 minutos al agitador de plataforma rotativo, luego 30 minutos al baño ultrasónico, y finalmente 10 minutos a centrifuga a 10000 rpm (equivalente a 7,2 g de aceleración). El líquido sobrenadante, se extrae de los tubos y se coloca en nuevos microtubos limpios correctamente identificados para las posteriores determinaciones analíticas.

#### Valores necesarios para posteriores cálculos de fenoles en uva:

Mh: Peso de la muestra de hollejo polvo usada para extracción (mg)

Ms: Peso de semillas molidas usada para extracción (mg)

REH: Relación extracción hollejo (mg hollejo / mL extractante) =  $H / 1,5$

RES: Relación extracción semilla (mg semilla / mL extractante) =  $S / 1,5$

#### Preparación de soluciones:

##### Solución de acetona 70%:

Medir 700 mL de acetona con la ayuda de una probeta. Trasvasar a matraz aforado de 1000 mL. Lavar repetidas veces con agua destilada volcando el producto del enjuague en el matraz. Agregar agua destilada para enrasar el matraz, tapar y mezclar suavemente.

Nota: Esta solución debe ser colocada en envases de color caramelo en lugar oscuro y fresco.

##### Solución 50% acetona (80%) + 50% metanol (80%):

Medir 400 mL de acetona, con probeta. Trasvasar a matraz aforado de 500 mL. Lavar repetidas veces con agua destilada volcando el producto del enjuague en el matraz. Agregar agua destilada para enrasar el matraz, tapar y mezclar suavemente (solución A).

Medir 400 mL de metanol p.a., con probeta. Trasvasar a matraz aforado de 500 mL. Lavar repetidas veces con agua destilada volcando el producto del enjuague en el matraz. Agregar agua destilada para enrasar el matraz, tapar y mezclar suavemente (solución B).

Mezclar estas dos soluciones preparadas (A y B) en partes iguales y llevar a pH 3,5 con ClH. Volcar en un frasco color caramelo y guardar en lugar fresco y oscuro.

#### Precauciones en la manipulación:

*Acetona:* es tóxico e inflamable, no inhalar vapores, por ello se debe trabajar bajo campana. Conservar en lugar bien ventilado y lejos de fuentes de calor.

*Metanol:* es tóxico tanto su inhalación, como su ingestión; e inflamable. Debe trabajarse bajo campana, con guantes y barbijo.



### 2.13. TANINOS CONDENSADOS O PROANTOCIANIDINAS. METODO DEL BUTANOL ÁCIDO (EN HOLLEJOS Y SEMILLAS)

Los taninos condensados o proantocianidinas son los fenoles flavonoides cuantitativamente más importantes en la uva. No solo intervienen en características organolépticas del vino como la astringencia y la concentración, sino que también son antioxidantes con propiedades beneficiosas para la salud humana. Las proantocianidinas están formadas por polímeros más o menos grandes de unidades 3-flavanoles y se denominan taninos debido a su capacidad de precipitar las proteínas. Los monómeros (3-flavanoles) se conocen genéricamente como catequinas y tienen un esqueleto común formado por dos anillos bencénicos y un anillo heterocíclico sin dobles ligaduras que contiene oxígeno (ver Parte 1: compuestos fenólicos de la uva). También son conocidos como proantocianidinas, por la propiedad de liberar antocianidinas en medio ácido y en caliente por la ruptura de sus uniones intermonoméricas.

Para realizar la determinación de taninos, se somete a los extractos de hollejos y semillas a una hidrólisis ácida, en caliente y en presencia de una sal de hierro (Fe) como catalizador. El método utilizado es el propuesto por Porter (1986) con algunas modificaciones presentadas por Ojeda (1999), mediante el uso de butanol ácido, basado en la reacción de Bate-Smith (1954). Esta hidrólisis transforma las proantocianidinas en antocianidinas. Las antocianidinas desarrolladas se miden con espectrofotometría VIS, previa deducción de las que poseía la muestra antes de la hidrólisis ácida (i.e., se cuantifican restando a un blanco sin hidrólisis ácida ni calor). La medición de absorbancia óptica se realiza a una longitud de onda de 550 nm. A partir de esta lectura, mediante cálculos se determina la cantidad de taninos o proantocianidinas en  $\text{mg kg}^{-1}$ . La escala patrón se realiza con una solución de distintas concentraciones de cianidina (Ojeda, 1999).

Tanto el extracto de hollejo, como el de semilla, utilizan como solvente una solución 50% v/v de acetona 80% y metanol 80% (consulte determinación 2.12).

Los taninos en el hollejo y la semilla alcanzan valores máximos cerca del envero y luego disminuyen entre envero y cosecha en función de las características del ciclo (Herbertson *et al.*, 2002; Downey *et al.*, 2003). Los taninos de las semillas, además, disminuyen su extractabilidad durante la maduración (Bogs *et al.*, 2005), debido a los cambios de la cutícula que limitan su extracción en la vinificación. Además, en la maduración las semillas se van deshidratando, oxidando y los taninos aumentan su grado de polimerización lo cual va acompañado con una disminución de amargor (Keller, 2009).

#### Materiales:

- Extracto de hollejo (obtenido en determinación 2.12)
- Extracto de semillas (obtenido en determinación 2.12)
- Microtubos plásticos con tapa de 2 mL (tipo eppendorf)
- Tubos de vidrio con tapa a rosca hermética (aproximadamente 10 mL; figura 2.18)
- Micropipetas de 100 a 1000  $\mu\text{L}$  y 1000 a 5000  $\mu\text{L}$
- Cubetas de vidrio, de 1 cm de paso óptico, para lectura en espectrofotómetro
- Espectrofotómetro de luz visible (Longitud de onda 550 nm)

- Baño maría a ebullición
- Reactivos:
  - a) Butanol p.a.
  - b) Solución de sulfato de hierro y amonio, en butanol acidificado con ácido clorhídrico (ver preparación más adelante)

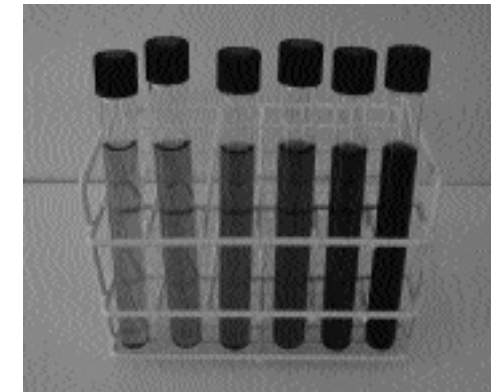


Figura 2.18: Gradilla con tubos de vidrio con tapa a rosca

#### Método:

##### Blanco:

En un tubo se agrega 400  $\mu\text{L}$  de butanol p.a. y 3,6 mL de solución de sulfato de hierro y amonio, se tapa y agita. Con este blanco asignamos el cero al espectrofotómetro para este método.

##### Para hollejos:

Se diluye al extracto de hollejos con una dilución 1:6 con butanol p.a. Para realizar esta dilución, en un microtubo plástico de 2 mL se agrega 200  $\mu\text{L}$  de este extracto con 1000  $\mu\text{L}$  de butanol p.a. mediante el uso de micropipetas. Tapar y agitar.

En dos tubos de vidrio con tapa a rosca se colocan 400  $\mu\text{L}$  del extracto diluido con butanol y 3,6 mL solución de sulfato de hierro y amonio acidificada, se tapan y agitan.

Uno de los tubos se lleva a baño maría en ebullición ( $95 \pm 0.2^\circ \text{C}$ ) por 30 o 40 minutos para transformar las proantocianidinas. Se saca el tubo y se enfría un instante en agua con hielo. Se realiza la lectura en espectrofotómetro inmediatamente. Es importante que la lectura no se prolongue más allá de unos pocos minutos después de haber sacado el microtubo del baño hirviendo, ya que las antocianidinas generadas son muy inestables y se oxidan rápidamente. Luego de enfriados y mientras se realizan las lecturas, los tubos que están a la espera, cuando se hacen una tanda de varias muestras, deben cubrirse con papel aluminio para evitar la foto-oxidación.

El otro tubo no se lleva a ebullición, sino se lee directamente con espectrofotómetro.

Cada tubo (el que ha sido sometido a hidrólisis caliente y el que no) se vuelca en una

cubeta del espectrofotómetro VIS (1 cm de paso óptico). Se hace la lectura y registro de la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm llevando a cero con el blanco preparado anteriormente.

Nota: Cuando se analiza más de una muestra, se realiza primero una tanda de lecturas con los tubos que no van a ebullición. Cuando los tubos que van a ebullición han terminado, se leen en una segunda tanda.

#### Para semillas:

Diluir el extracto de semilla con butanol p.a. en una dilución 1:6. Para esto se coloca en un tubo plástico con tapa de 2 mL, 200 µL del extracto de semillas y 1000 µL de butanol p.a. Luego tapar y agitar.

En dos tubos de vidrio con tapa a rosca se colocan 400 µL del extracto de semillas diluido con butanol y 3,6 mL solución de sulfato de hierro y amonio, se tapan y agitan.

A partir de este punto proceder de la misma manera que para hollejos.

#### Cálculos de resultados:

Además de los valores de absorbancia, se necesitan los valores obtenidos en las determinaciones 2.4 y 2.12, tales como peso medio baya, peso medio hollejo baya<sup>-1</sup>, número de semillas baya<sup>-1</sup>, peso medio semilla baya<sup>-1</sup> y peso de muestra usada en extracción (mg).

A la lectura de absorbancia de los tubos con hidrólisis caliente, debe descontarse la lectura realizada con el extracto sin hidrólisis, para deducir los antocianos presentes en el vino previos a ella.

$$\text{Lectura } DO_{550} = L2 - L1$$

L1: Lectura DO 550 nm extracto diluido (de hollejos o semilla) sin baño maría

L2: Lectura DO 550 nm extracto diluido (de hollejos o semilla) con baño maría

La concentración de taninos, se calcula en mg L<sup>-1</sup> de la solución evaluada en cubeta a partir de la última curva de calibración. La misma se realiza registrando las distintas DO a 550 nm obtenidas por diferentes concentraciones de cianidina (Ojeda, 1999).

En la última curva de calibración realizada en el Laboratorio de Viticultura, se determinó la siguiente ecuación, que puede ser utilizada si no se dispone de un patrón de cianidina.

$$\text{Taninos (mg L}^{-1}\text{ solución evaluada)} = [\text{Lectura } DO_{550} \times 441]$$

Teniendo en cuenta la dilución del extracto con butanol y con la solución extractante realizada en capítulo 2.12, podemos determinar los valores de taninos o proantocianidinas en hollejos o semillas expresados en mg kg uva<sup>-1</sup> o en mg baya<sup>-1</sup>. Las fórmulas se

presentan a continuación, teniendo en cuenta que también es necesario contar con las relaciones de hollejo y semillas obtenidas en capítulo 2.4:

$$\text{Taninos holl. (mg kg uva}^{-1}\text{)} = \text{Tan. mg L}^{-1} \times D \times \underbrace{(V / Mh)}_{\text{Inversa relación extracción hollejo (REH)}} \times \underbrace{(PHoll \times 1000 / PBaya)}_{\text{Relación hollejo/uva (g kg}^{-1}\text{ uva)}}$$

$$\text{Taninos holl. (mg baya}^{-1}\text{)} = \text{Taninos holl. (mg kg uva}^{-1}\text{)} \times \underbrace{(PBaya / 1000)}_{\text{Inversa relación bayas kg uva}^{-1}}$$

Tan.: taninos mg L<sup>-1</sup> en solución evaluada (resultado de fórmula vista anteriormente)

D: Dilución previa a la determinación en este caso 6

V: Volumen usado de polvo de hollejos en extractante acetona + metanol, 1,5 mL; de acuerdo al apartado 2.12

Mh: mg de hollejos usados en extracción, de acuerdo al apartado 2.12

PHoll: Peso medio hollejo por baya (g), de acuerdo al apartado 2.4

PBay: Peso medio baya (g), de acuerdo al apartado 2.4

$$\text{Taninos semilla (mg kg uva}^{-1}\text{)} = \text{Tan. mg L}^{-1} \times \underbrace{(V / Ms)}_{\text{Inversa relación extracción semilla (RES)}} \times \underbrace{(PSem \times 1000 / PBaya)}_{\text{Relación semilla/uva (g kg}^{-1}\text{ uva)}}$$

$$\text{Taninos semilla (mg baya}^{-1}\text{)} = \text{Taninos semilla (mg kg uva}^{-1}\text{)} \times \underbrace{(PBaya / 1000)}_{\text{Inversa relación bayas kg uva}^{-1}}$$

Tan: taninos mg L<sup>-1</sup> en solución evaluada (resultado de fórmula vista anteriormente)

D: Dilución previa a la determinación, se debe colocar 6

V: Volumen usado de extractante acetona + metanol en semillas molidas; 1,5 mL

Ms: mg de semillas usados en extracción

PSem: Peso medio semilla por baya (g)

PBay: Peso medio baya (g)

En la tabla 2.18 y 2.19 se presentan valores medios e intervalos de confianza, de contenidos de taninos de hollejos en muestras de uva de distintas variedades recolectadas a cosecha (Laboratorio de Viticultura del INTA Mendoza).

Tabla 2.18: Valores promedios de taninos en hollejo mg Kg uva<sup>-1</sup> obtenidos al momento de cosecha del ciclo 2005-06 y 2006-07, en distintas variedades

Variedad	Cantidad de determinaciones	Proantocianidinas mg kg uva <sup>-1</sup>		
		media	Intervalo confianza 95%*	
Bonarda	27	3211	2957	3464
Cabernet Sauvignon	75	3981	3679	4283
Malbec	402	4930	4797	5064
Merlot	48	3432	3287	3578
Syrah	246	3186	3017	3354

\*El intervalo de confianza indica el rango de valores que puede tomar la media en la población para el nivel de confianza indicado.

Tabla 2.19: Valores promedios de taninos en hollejo mg baya<sup>-1</sup>, obtenidos al momento de cosecha del ciclo 2005-06 y 2006-07, en distintas variedades

Variedad	Cantidad de determinaciones	Proantocianidinas mg kg uva <sup>-1</sup>		
		media	Intervalo confianza 95%*	
Bonarda	27	8,19	7,39	8,99
Cabernet Sauvignon	75	4,82	4,46	5,17
Malbec	402	8,02	7,76	8,29
Merlot	48	4,52	4,32	4,72
Syrah	246	4,80	4,53	5,06

\*El intervalo de confianza indica el rango de valores que puede tomar la media en la población para el nivel de confianza indicado.

### Preparación de soluciones:

#### Preparación de solución de sulfato de hierro y amonio acidificada con CIH:

Pesar 181 mg de Sulfato de hierro y amonio dodecahidratado,  $(\text{SO}_4)_2\text{NH}_4\text{Fe} + 12\text{H}_2\text{O}$ , conservado en heladera. Trasvasar en forma cuantitativa la droga pesada a un matraz de 200 mL. Agregar al matraz un pequeño volumen de butanol p.a., para disolución del sólido. Agregar 20 mL de ácido clorhídrico 37%. Llevar a volumen y enrasar el matraz con butanol p.a. En caso de preparar otro volumen de solución, utilizar tabla 2.20.

Tabla 2.20: Cantidades a agregar para preparación de solución de sulfato de hierro y amonio acidificada

Volumen matraz (mL)	$(\text{SO}_4)_2\text{NH}_4\text{Fe} + 12\text{H}_2\text{O}$ (g)	CIH 37% (mL)
50	0,0453	5
100	0,0905	10
250	0,2262	25
500	0,4530	50

### Precauciones en la manipulación:

*Butanol:* trabajar con cuidado bajo campana, es nocivo para la salud.

*Ácido clorhídrico (CIH):* debe trabajarse bajo campana debido a su alta tensión de vapor y evitar contacto con la piel (con guantes de látex) ya que es sumamente corrosivo. **Nunca pipetear directamente, sino utilizar propipeta.**

*Metanol:* es tóxico tanto su inhalación como su ingestión y inflamable. Debe trabajarse bajo campana, con guantes y barbijo.

*Acetona:* es tóxico e inflamable, no inhalar vapores por ello se debe trabajar bajo campana. Conservar en lugar bien ventilado y lejos de fuentes de calor.

## 2.14. CATEQUINAS O 3-FLAVANOLES MONÓMEROS (EN HOLLEJOS Y SEMILLAS)

Dentro de los fenoles flavonoides de la uva, se conoce genéricamente como catequinas a los monómeros de los 3-flavanoles. Estos compuestos tienen una estructura común formada por dos anillos bencénicos (A y B) y un anillo heterocíclico (C) sin dobles ligaduras y contiene oxígeno (ver capítulo 1.1, tema 3-flavanoles). Los principales 3-flavanoles monómeros encontrados en la uva son la (+)-catequina y su isómero la (-)-epicatequina, pudiéndose encontrarse este último bajo la forma de éster gálico (galato). En menor cantidad existen las formas galocatequina, epigalocatequina y epigalocatequina galato. Las catequinas son amargas y ligeramente astringentes, pero no precipitan con las proteínas, como lo hacen sus polímeros.

La determinación de catequinas se basa en la utilización de un método colorimétrico rápido utilizando p-dimetilamino cinamaldehído (DMCA) en condiciones de fuerte acidez (McMurrugh y McDowell, 1978). Este método fue comparado con otros alternativos en el trabajo de Zironi *et al.* (1992). Los resultados obtenidos con este método con respecto al de sulphuric vanillin, son muy similares; siendo las diferencias no significativas, según el trabajo citado anteriormente. La reacción no es específica para las catequinas, pues otros fenoles como 3-flavanoles oligómeros y antocianos pueden interferir en la reacción. Este método no puede ser considerado como específico de catequinas, sino tan sólo como un índice de control de su contenido. La reacción obtenida con este reactivo es muy rápida, desarrollando una coloración azulada la cual es cuantificada con espectrofotómetro VIS, a 640 nm. El aparato debe ser calibrado con una solución patrón de (+)-catequina a distintas concentraciones.

Para realizar esta determinación se utilizan los extractos de hollejos y semillas obtenidos en determinación 2.12, usando como solvente acetona 70% v/v.

### Materiales:

- Espectrofotómetro de luz visible (Longitud de onda 640 nm)
- Cubetas de vidrio de 1 cm de paso óptico, para lectura en espectrofotómetro
- Extracto de hollejo (obtenido en determinación 2.12)
- Extracto de semillas (obtenido en determinación 2.12)
- Microtubos plásticos con tapa de 2 mL (tipo eppendorf)
- Tubos plásticos con tapa de 5 mL
- Micropipeta automática de 100 a 1000  $\mu\text{L}$
- Micropipeta automática de 1000 a 5000  $\mu\text{L}$
- Reactivos:
  - a) DMCA o p-dimetilamino cinamaldehído
  - b) Metanol absoluto p.a.
  - d) CIH concentrado (37% ó 12N)

### Método:

Blanco:

En un tubo se agrega 600  $\mu\text{L}$  de metanol, con 3 mL de solución de DMCA, tapar y homogeneizar. Dejar transcurrir 10 minutos luego de la adición del DMCA, leer en espectrofotómetro para asignarle el cero para este método.

Para hollejos:

Diluir 1:10 el extracto de hollejo<sup>10</sup> en el cual se utilizó como solvente una solución de acetona 70% v/v. Para realizar esta dilución se debe medir en una micropipeta 100  $\mu\text{L}$  del extracto de hollejo y 900  $\mu\text{L}$  de metanol, colocarlos en un tubo plástico de 2 mL, tapar y agitar.

Posteriormente en un tubo plástico, se debe agregar 600  $\mu\text{L}$  de este extracto de hollejo diluido con metanol, luego 3 mL de solución de DMCA, tapar y homogeneizar. A partir del momento de agregado de la solución de DMCA, se deja reposar 10 minutos para desarrollo del color de la reacción. Colocar en cubeta de espectrofotómetro de 1 cm de paso óptico, el contenido del tubo plástico. Realizar y registrar lectura de absorbancia de la muestra, en espectrofotómetro VIS a una longitud de onda de 640 nm, llevando a cero el aparato con el blanco de reactivo.

Para semillas:

Diluir 1:50 el extracto de semilla con metanol absoluto p.a.. Esta dilución se realiza en un tubo plástico con tapa de 2 mL, agregando con micropipeta automática 20  $\mu\text{L}$  de extracto y 980  $\mu\text{L}$  de metanol. Tapar y agitar.

En tubo plástico de 5 mL, se agrega 600  $\mu\text{L}$  de este extracto de semilla diluido con metanol, luego 3 mL de solución de DMCA. A partir de este momento se procede igual que en hollejos.

### Cálculo de resultados:

Además de los valores de absorbancia, se necesitan los valores obtenidos en las determinaciones 2.4 y 2.12, tales como peso medio baya, peso medio hollejo baya<sup>-1</sup>, peso medio semilla baya<sup>-1</sup> y peso de muestra (mg) usada en la extracción.

La concentración de catequinas, se calcula en  $\text{mg L}^{-1}$  de la solución evaluada en cubeta (extracto + metanol), a partir de una curva de calibración. La misma se obtiene registrando las distintas DO a 640 nm producidas por concentraciones crecientes de (+)-catequina en una solución de etanol 10% (Zironi, 1992).

### Obtención de curva calibración:

Se preparan soluciones estándares de (+)-catequinas con concentraciones semejantes a la de la solución que se evaluará tales como: 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 30  $\text{mg L}^{-1}$ ; en etanol 10% (v/v).

En tubo plástico de 5 mL, se agrega 600  $\mu\text{L}$  de cada concentración del estándar, luego 3 mL de solución de DMCA. A partir de este momento se procede igual que en hollejos y semillas.

<sup>10</sup> En el caso de hollejos de uvas obtenidas previo al envero, se trabaja con dilución 1:20, debido a los altos contenidos de catequina en esta etapa.

La lectura en cada concentración de (+)-catequinas debe ser registrada como figura en tabla 2.21 y graficada (figura 2.19) para la obtención de la curva de calibración en el rango de las concentraciones a cuantificar.

Tabla 2.21: Ejemplo de lecturas de DO<sub>640</sub> a distintas concentraciones de catequinas para obtención de una curva de calibración

Concentración (+)-catequina mg L <sup>-1</sup>	Lectura de DO <sub>640</sub>
1	0,11
5	0,27
10	0,46
15	0,66
20	0,85
25	1,04

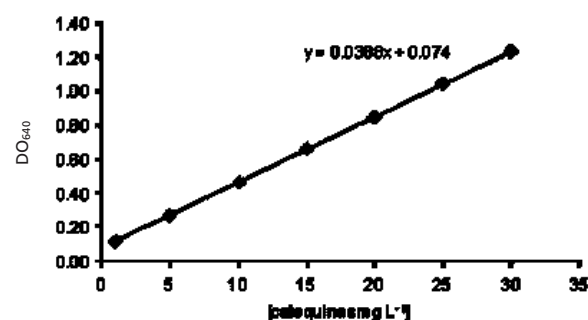


Figura 2.19: Curva calibración con soluciones de (+)- catequinas

Si la ecuación es  $DO_{640} = a + b \times \text{catequinas mg L}^{-1}$ ; o sea:  $DO_{640} = 0,074 + 0,0388 \times \text{catequina}$

a: 0,074

b: 0,0388

Entonces:  $\text{Catequinas mg L}^{-1} = (DO_{640} - a) / b$

Nota: El coeficiente de determinación del modelo lineal (R<sup>2</sup>) debe dar mayor a 0.98; si no repetir la calibración.

Teniendo en cuenta las diluciones, podemos determinar los valores de catequinas en hollejo y semilla en mg kg uva<sup>-1</sup> o en mg baya<sup>-1</sup>; mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Cat. hollejo (mg kg uva}^{-1}\text{)} = \text{Cat mg L}^{-1} \times D \times \underbrace{(V / Mh)}_{\text{Relación hollejo/uva (g kg}^{-1}\text{ uva)}} \times \underbrace{(PHoll \times 1000 / PBaya)}_{\text{Inversa relación extracción hollejo (REH)}}$$

$$\text{Cat. hollejo (mg baya}^{-1}\text{)} = \text{Cat. hollejo (mg kg uva}^{-1}\text{)} \times \underbrace{(PBaya / 1000)}_{\text{Inversa relación bayas kg uva}^{-1}}$$

Cat: Catequinas mg L<sup>-1</sup> en solución evaluada (hollejos)

D: Dilución previa a la determinación, se debe colocar 10

V: Volumen usado de extractante acetona 70% en polvo de hollejos; 1,5 mL, de acuerdo al apartado 2.12

Mh: Peso de hollejos usados en extracción con acetona 70% en mg, de acuerdo al apartado 2.12

PHoll: Peso medio hollejo por baya (g) de acuerdo al apartado 2.4

PBayas: Peso medio baya (g) de acuerdo al apartado 2.4

$$\text{Cat. semilla (mg kg uva}^{-1}\text{)} = \text{Cat mg L}^{-1} \times D \times \underbrace{(V / Ms)}_{\text{Inversa relación extracción semilla (RES)}} \times \underbrace{(PS \times 1000 / PBaya)}_{\text{Relación semilla/uva (g kg}^{-1}\text{ uva)}}$$

$$\text{Cat. semilla (mg baya}^{-1}\text{)} = \text{Cat. semilla (mg kg uva}^{-1}\text{)} \times \underbrace{(PBaya / 1000)}_{\text{Inversa relación bayas kg uva}^{-1}}$$

Cat: Catequinas mg L<sup>-1</sup> en solución evaluada (semillas)

D: Dilución previa a la determinación, se debe colocar 50

V: Volumen usado de extractante acetona 70% en semillas molidas; 1,5 mL, de acuerdo al apartado 2.12

Ms: mg de semillas usados en extracción con acetona 70%, de acuerdo al apartado 2.12

PS: Peso medio semilla por baya (g), de acuerdo al apartado 2.4

PBayas: Peso medio baya (g), de acuerdo al apartado 2.4

En las tablas 2.22 y 2.23 se presentan los valores medios y los intervalos de confianza de contenidos de catequinas en hollejos de muestras de uva de distintas variedades recolectadas a cosecha (Laboratorio de Viticultura del INTA Mendoza).

Tabla 2.22: Valores promedios de catequinas en mg kg uva<sup>-1</sup>, obtenidos al momento de cosecha del ciclo 2005-06 y 2006-07, en distintas variedades

Variedad	Cantidad de determinaciones	Catequinas ó flavan-3-oles mg kg uva <sup>-1</sup>		
		media	Intervalo confianza 95%*	
Bonarda	27	355	328	381
Cabernet Sauvignon	75	408	388	429
Malbec	402	559	546	572
Merlot	48	402	288	517
Syrah	246	345	335	355

\*El intervalo de confianza indica el rango de valores que puede tomar la media en la población para el nivel de confianza indicado.

Tabla 2.23: Valores promedios de catequinas en mg baya<sup>-1</sup>, obtenidos al momento de cosecha del ciclo 2005-06 y 2006-07, en distintas variedades

Variedad	Cantidad de determinaciones	Catequinas ó flavan-3-oles mg baya <sup>-1</sup>		
		media	Intervalo confianza 95%*	
Bonarda	27	0,90	0,83	0,97
Cabernet Sauvignon	75	0,59	0,47	0,53
Malbec	402	0,90	0,88	0,93
Merlot	48	0,3	0,38	0,67
Syrah	246	0,52	0,50	0,53

\*El intervalo de confianza indica el rango de valores que puede tomar la media en la población para el nivel de confianza indicado.

### Preparación de soluciones:

#### Preparación de solución de DMCA (dimetilamino cinamaldehido)

Pesar 0,1 g de DMCA en balanza de precisión. Trasvasar esta droga pesada a un matraz de 100 mL en forma cuantitativa. Agregar 10 mL de CIH concentrado (12 N o al 37%). Llevar a volumen y enrasar con metanol absoluto p.a. Para preparar otros volúmenes, usar valores de tabla 2.24.

Tabla 2.24: Cantidades a agregar para preparación de solución de DMCA

Volumen a preparar (mL)	DMCA (g)	Volumen CIH 37% (mL)
25	0,025	2,5
50	0,05	5,0
250	0,25	25,0

Advertencia: Esta solución puede ser conservada por una semana en heladera y tapan-do frasco con film aluminio para evitar su foto-oxidación. De todas maneras conviene preparar la solución cada vez que se realicen determinaciones.

### Precauciones en la manipulación:

**Ácido clorhídrico (CIH):** debe trabajarse bajo campana debido a su alta tensión de vapor y evitar contacto con la piel (guantes látex) ya que es sumamente corrosivo.

**Dimetilamino cinamaldehido (DMCA):** es irritante para piel y ojos. Durante toda la técnica se debe trabajar con guantes de látex y evitar el contacto con los ojos.

**Metanol:** es tóxico tanto su inhalación como su ingestión y inflamable. Debe trabajarse bajo campana, con guantes y barbijo.

## 2.15. POLIFENOLES TOTALES EN SEMILLAS

La técnica se basa en la actividad óptica específica del anillo fenólico en el sector ultravioleta del espectro (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2002). Los polifenoles totales se estiman como índice de polifenoles totales (IPT) a través de la medición espectrofotométrica a una longitud de onda de 280 nm en extractos de semillas.

### Materiales:

- Extracto de semillas (obtenido en capítulo 2.12)
- Espectrofotómetro que opere en luz UV, las lecturas se realizarán a 280 nm de longitud de onda.
- Cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico
- Micropipeta automática de 100 a 1000 µL
- Matraz 5 mL (puede ser remplazado con el uso de micropipeta)

### Método:

#### Blanco:

Lectura con agua destilada en cubeta del espectrofotómetro de 1 cm de paso óptico.

#### Para semilla:

Realizar una dilución 1:100 del extracto de semilla, con agua destilada, usando un matraz aforado de 5 mL. Para lo cual se miden con micropipeta automática 50 µL de extracto de semilla, se vuelcan en un matraz de 5 mL y se enrasa con agua destilada.

Prender el espectrofotómetro UV-VIS a 280 nm, 30 minutos antes de la lectura para estabilizar la lámpara de deuterio<sup>11</sup>. Leer en espectrofotómetro colocando la muestra diluída en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, llevando el aparato a cero con el blanco.

### Cálculo de resultado:

$$\text{IPT extracto} = (DO_{280} - 4) \times 100$$

$$\text{IPT semilla} = \text{IPT extracto} \times (26 / Ms)$$

Ms: Peso de semillas usados en realización del extracto con acetona+metanol en mg, de acuerdo a apartado 2.12.

26: Es un peso promedio de semillas en mg en este tipo de análisis.

$$\text{IPT semilla referido a kg de uva} = \text{IPT semilla} \times (F / 30)$$

F: Relación semilla/uva (g kg<sup>-1</sup> uva), calculado de acuerdo al apartado 2.4.

30: valor promedio de la relación semilla/uva en este tipo de análisis (g kg<sup>-1</sup> uva).

<sup>11</sup> Las lámparas de Xenon para medición a 280 nm en general no necesitan ser precalentadas antes de la lectura.

## 2.16. DEGUSTACIÓN DE BAYAS PARA MONITOREAR MADURACIÓN

La madurez de la uva, puede considerarse desde distintos puntos de vista. La madurez tecnológica o madurez de la pulpa corresponde al estado en el cual la acumulación de azúcares en la pulpa es la adecuada a determinado tipo de vino. También puede hablarse de la madurez fenólica. Esta es alcanzada cuando las paredes celulares están suficientemente degradadas para permitir una buena extracción de los mismos, el potencial antocianinas es máximo y la contribución de los taninos de las semillas a la concentración total de taninos es baja, ya que su epidermis está lignificada. Tanta importancia ha adquirido el concepto de madurez fenólica, que la semilla ha pasado a ser un factor principal en el control de la madurez de la uva. La búsqueda de *semillas maduras* sin resto alguno de otro color que no sea el marrón oscuro, es muchas veces el objetivo a lograr. En muchos casos esta búsqueda lleva a cosechas con muy altas concentraciones de azúcar y con riesgos de alteraciones microbiológicas.

La calidad de un vino está determinada en parte por la calidad de la uva vinificada. Por lo tanto, llevar un seguimiento de la composición de las bayas durante la maduración y tomar una correcta decisión del momento de cosecha es fundamental para obtener la composición deseada. Esto es válido no sólo para el azúcar, la acidez y el pH, sino que también para los polifenoles, compuestos determinantes de color y astringencia en tintos y también para los aromas, igualmente importantes en blancos y tintos.

Si bien existe una tendencia a cosechar uvas sobremaduras, en busca de madurez de taninos, concentración y aromas de frutas madura y mermelada, en muchas zonas, las condiciones climáticas del otoño, en particular las lluvias, marcan el límite posible a alcanzar.

Los esfuerzos deben dirigirse en la búsqueda del equilibrio. Debe buscarse una madurez conducente a vinos más naturales, que no requieran los altos niveles de corrección de la materia prima necesarios con una madurez pobre o exagerada.

Sin embargo, a pesar de su gran utilidad, los análisis químicos y físico-químicos permiten sólo una visión parcial de la madurez. Al igual que en los vinos, el análisis sensorial descriptivo y cuantificado constituye una herramienta útil de caracterización, con la condición de utilizarlo siempre en condiciones adecuadas y con descriptores precisos y bien definidos. El análisis sensorial se convierte en una herramienta, que complementa (no reemplaza) a los análisis químicos.

A partir de la experiencia adquirida en los vinos, el I.C.V. (Instituto Cooperativo del Vino) de Francia, elaboró un método estándar para el análisis sensorial de la uva según las reglas de medición sensorial (norma ISO 11035)

El siguiente protocolo se apoya en la metodología del I.C.V., con algunas modificaciones basadas en la experiencia de enólogos argentinos.

El fundamento del método es la segmentación del análisis según los tres principales componentes de la baya: la pulpa, la piel y las semillas como se muestra en la figura 2.20. Utilizando una lista de descriptores, los degustadores pueden hacer una evaluación sensorial de la calidad enológica potencial de la uva.

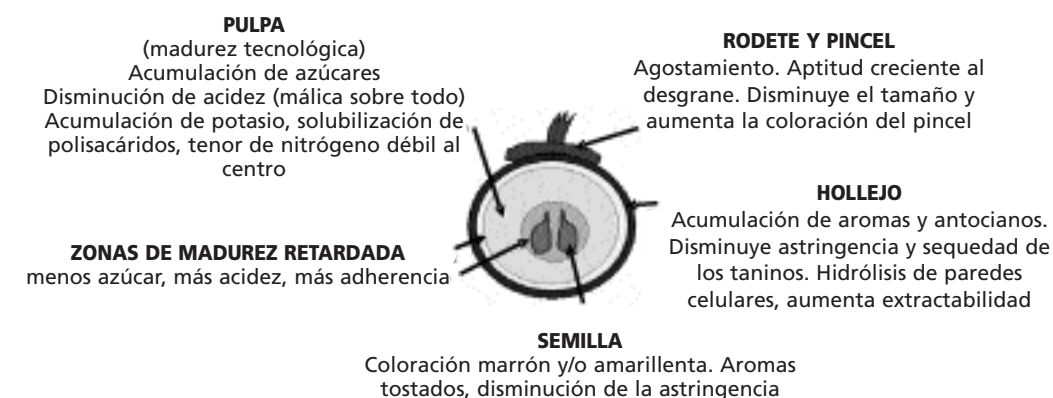


Figura 2.20: Partes de la baya. Principales componentes, su evolución

### Método:

Lo primero es un correcto muestreo de bayas a campo y su posterior. La madurez de la uva está caracterizada por su asincronía. En la misma hilera, los racimos de la cabecera, los del centro y los de los pies no maduran a la misma velocidad. Lo mismo ocurre con los racimos del lado del Este o del Oeste. Más aún los granos del hombro, del medio o del extremo distal del racimo, tampoco maduran simultáneamente. Por lo tanto la muestra debe representar a todas esas situaciones. Primero debe recorrerse el viñedo y determinar los sectores de los que se extraerá la muestra. Se sacarán tantas muestras como situaciones diferentes se encuentren. Cada muestra está constituida por 200 bayas. Los granos se cortan con su pedicelo. En las variedades donde resulte difícil sacar los granos enteros por ser sus racimos muy apretados, se cortan gajos. Los granos o los gajos, se colocan en bolsas plásticas bien identificadas y con su identificación y cerradas se colocan en una heladerita de camping. Si las muestras se analizan en un plazo de 2 ó 3 horas no hace falta colocar hielo. Llegadas al laboratorio, las muestras se separan en platos o bandejas plásticas bien identificadas. El análisis sensorial se realiza en lotes de tres bayas, probadas simultáneamente separando el análisis: examen visual y táctil de las bayas (A), análisis gustativo de la pulpa y de la piel (B), examen visual y análisis gustativo de las semillas (C y D).

Cada uno de los descriptores es evaluado utilizando una escala de 1 a 4 puntos correspondientes a una gradación de madurez creciente en la mayoría de los descriptores.

### A. Examen visual y táctil de las bayas

Antes de separar las bayas de su pedicelo, prensar ligeramente los granos ejerciendo la misma presión cada vez y evaluar la facilidad de aplastamiento (descriptor 1). Después separar la baya del pedicelo evaluando la facilidad de desgranado (descriptor 2). Finalmente, examinar la película, sobretodo en el punto de inserción del pedicelo, y evaluar su color (descriptor 3).

**Descriptor 1- Facilidad de aplastamiento de la baya:**

Aumenta con la madurez del grano. Puntuar con ayuda de la escala siguiente, la sensación percibida cuando se prensa el grano entre los dedos.

- 1: la baya dura sólo rompe bajo fuerte presión.
- 2: la baya se deforma ligeramente entre los dedos, muy elástica, retoma su forma inicial.
- 3: la baya se deforma fácilmente, ligeramente plástica, tarda en retomar su forma inicial.
- 4: baya blanda, se aplasta con una ligera presión y casi no recupera su forma original.

**Descriptor 2: Facilidad de desgranado**

Aumenta con la madurez. Se debe evaluar la facilidad con la que la baya se separa del pedicelo con la escala siguiente:

- 1: baya fuertemente adherida, el pedicelo se separa con gran dificultad desgarrando la película.
- 2: baya adherida, el pedicelo se separa con dificultad y queda adherida a él gran parte de la pulpa.
- 3: la baya se despega con facilidad, al pedicelo queda adherido a un poco de pulpa sin color.
- 4: la baya se separa muy fácilmente, sólo queda adherida al pincel del pedicelo un poquito de pulpa; pincel rojo en las variedades tintas.

**Descriptor 3: Color de los granos**

Aumenta con la madurez de la baya. Se debe evaluar el color de la película con ayuda de la tabla 2.25. En caso de heterogeneidad, evaluar el color más bajo percibido, observando particularmente la zona de inserción del pedicelo.

Tabla 2.25: Apreciación del color de los granos

PUNTOS	UVA TINTA	UVA BLANCA
1	Negro azulado débil (con sectores verdes)	Verde o Amarillo pajizo
2	Negro azulado débil pero uniforme	Verde amarillento
3	Negro azulado	Amarillo leve
4	Negro azulado oscuro	Amarillo

**B. Degustación de la pulpa**

Introducir la uva en la boca (unos 3 granos); extraer la pulpa de cada una de las tres bayas prensando sucesivamente cada baya entre la lengua y el paladar; conservar en la boca las tres pulpas; escupir las pieles y las semillas y descartarlas; extraer el mosto aplastando completamente la pulpa entre la lengua y el paladar. Con la mezcla de mos-

to de las tres bayas, notar la sensación dulce, ácida, el tipo y la intensidad de los aromas (descriptor 5 y 6).

Durante las operaciones de separación de la pulpa y de la película evaluar la eventual presencia de pulpa adherente. Finalmente, en el masticado posterior de la piel, evaluar una eventual liberación de mosto. Estos tres parámetros permiten evaluar la adherencia de la pulpa (descriptor 4).

**Descriptor 4: Adherencia de la pulpa**

Disminuye con la maduración de la uva. En este caso se debe evaluar la sensación percibida en los diferentes estadios del análisis sensorial descrito en la escala siguiente:

- 1: pulpa fuertemente adherida a la piel y a las semillas.
- 2: fina capa de pulpa adherida notable en observación o haciendo resbalar la piel entre los dedos o entre los dientes.
- 3: fina capa de pulpa poco visible, pero liberación de mosto cuando se mastican las películas.
- 4: no hay capa de pulpa visible, y no hay liberación de mosto al masticar las pieles.

**Descriptor 5: Azúcar en la pulpa:**

Aumenta con la madurez. Notar la sensación percibida, tras la separación de la piel, en la mezcla del mosto de los tres granos.

- 1: pulpa poco dulce (acidez dominante); pulpa muy dulce (sin acidez)
- 2: pulpa medianamente dulce (bastante ácida)
- 3: pulpa dulce (acidez destacada)
- 4: pulpa muy dulce (acidez presente)

**Descriptor 6: Aromas de la pulpa**

Aumentan con la madurez de la baya. Notar los aromas dominantes que se desprenden en la degustación del mosto de las tres bayas según la siguiente escala:

- 1: de uvas verdes (herbáceos); de uvas sobremaduras (pasas, compota), defectuosos (mufa, tierra)
- 2: neutro
- 3: frutado
- 4: frutado, confitura o mermelada

**C. Degustación de la película**

Con los dedos índice y pulgar apretar, una a la vez, tres bayas de modo de sacar la pulpa y semilla y quedarse sólo con la piel. Meterse en la boca las tres películas conservando las semillas de estas bayas junto con las otras de la degustación de la pulpa. Masticar de 10 a 15 veces. Mientras se va masticando, evaluar la facilidad de dilaceración de las pieles (descriptor 7). Después pasar la masa así obtenida por el paladar, y luego por



el resto de la boca y por las encías y las mucosas labiales. Después de escupir, pasar la lengua por el paladar de atrás hacia adelante dos veces notando la intensidad tánica (descriptor 8); después, evaluar la acidez de la pulpa adherida a la película. Tratar de resbalar la lengua por las encías y notar la astringencia de la película. Por último notar el tipo de aromas de la película y su intensidad (descriptor 9).

#### Descriptor 7: Facilidad de dilaceración de las pieles

Aumenta con la madurez. Se evalúa la dificultad de dilacerar la película, masticando entre los molares, examinando la textura de la masa obtenida con la ayuda de la siguiente escala:

- 1: película dura, después de masticar presencia de fragmentos groseros o muy blanda (casi se deshace sin necesidad de masticarla)
- 2: película dura, presencia de fragmentos finos después de masticar.
- 3: la película se dilacera fácilmente, formación de una pasta casi homogénea.
- 4: película se dilacera con mucha facilidad, rápida formación de una pasta muy homogénea.

#### Descriptor 8: Intensidad tánica de la película. Astringencia:

Se evalúa el paso más o menos dificultoso de la lengua dos veces por el paladar (impresión de rugosidad) después de haber pasado la pasta por el paladar.

- 1: la lengua resbala sin esfuerzo por el paladar
- 2: la lengua se desliza con algo de dificultad por sectores del paladar
- 3: la lengua resbala con dificultad por todo el paladar
- 4: la lengua resbala con gran dificultad.

Muchas veces, este parámetro depende más de la variedad que de la madurez, y no progresa de manera regular a lo largo de la maduración.

#### Descriptor 9: Tipo de aromas de la película

Evoluciona durante la maduración de las bayas. Notar los aromas dominantes que se desprenden en la degustación de las películas de los 3 granos según la escala siguiente:

- 1 punto: de uvas verdes (herbáceos); de uvas sobremaduras (pasas, compota); defectuosos (mufa, tierra)
- 2 puntos: neutro
- 3 puntos: frutado
- 4 puntos: frutado y confitura o mermelada

#### D. Examen de las semillas

Se examina normalmente el color y si quedan trazos verdes (descriptor 10). No debe morirse la semilla por que su fuerte astringencia podría saturar las células sensoriales de las mucosas y privar al degustador de sus aptitudes para degustar durante varios minutos.

#### Descriptor 10: Color de las semillas

Aumenta con la maduración. Puntuar el color externo de la mayoría de las semillas con ayuda de la siguiente escala:

- 1: blanco o amarillo verdoso
- 2: marrón – verde (en partes iguales)
- 3: marrón con algunas vetas o líneas verdes
- 4: marrón más o menos oscuro pero homogéneo

#### Interpretación de los resultados:

Todos los descriptores comentados arriba podrían sintetizarse en una tabla de interpretación (Tabla 2.16). Esta reagrupa los descriptores en cuatro clases. Cada clase corresponde a una fase superior de la madurez, en el aspecto sensorial: madurez tecnológica de la pulpa; madurez aromática de la pulpa; madurez aromática de la película, madurez tánica de la uva.

Tabla 2.16: Interpretación de la evaluación de descriptores

MADUREZ DE LAS BAYAS					
Puntaje	1	2	3	4	1 (Anomalías)
<b>Madurez tecnológica</b>	Pulpa poco dulce, ácida, adherida a la piel y a las semillas	Pulpa medianamente dulce, ligeramente ácida; algo de pulpa adherida a la piel y semillas	Pulpa dulce, acidez presente, muy poca pulpa adherida a la piel y semillas	Pulpa con azúcar dominante y acidez presente, sin pulpa adherida a la piel y semillas	Pulpa poco dulce y poco ácida
<b>Madurez aromática de la pulpa</b>	Herbáceo	Neutro	Poco o medianamente frutado	Frutado intenso, confituras	Moho, terroso, fenoles
<b>Madurez aromática de la piel</b>	Piel dura, con notas herbáceas	Bastante dura, con notas herbáceas leves o neutra	Piel blanda, con notas frutadas y final herbáceo	Piel que se deshace en la masticación, notas frutadas intensas y de confituras	Moho, terroso, fenoles, piel frágil y verde
<b>Madurez de los taninos</b>	Reflejos verdes en las blancas y rosados en las tintas, piel ácida y secante, sin intensidad tánica. Taninos vulgares, semillas verdes o amarillo verdosas	Reflejos verdes en las blancas y rosados en las tintas, en la inserción del pedicelo. Piel medianamente ácida y secante. Taninos bastante vulgares, semillas marrones - verdosas	Color uniforme de la variedad, fuerte extracción de color en las tintas, piel bastante blanda, taninos delicados, semillas marrones, sin restos verdes, notas tostadas, sequedad baja	Color uniforme, fuerte extracción en la saliva o al estrujar el grano entre los dedos, la piel se deshace fácilmente, no hay sequedad, taninos suaves. Semillas marrón oscuras, notas tostadas y de torrefacción, sin sequedad.	Piel dura, herbácea, pulpa ácida

**Ejemplos de interpretación:**

Las uvas que llegan al nivel de madurez completa en cada clase, pueden ser consideradas como completamente maduras y pueden ser destinadas a elaborar vinos de alta gama y si se deseara con maceraciones largas en caso de tintos, aptos para la guarda si ese fuera el objetivo y se dieran otras condiciones estrictamente enológicas.

Las que consiguen una buena maduración tecnológica, pero falta madurar del todo los aromas y los taninos son aptas para producir vinos sin defectos, de gama media, siempre que la elaboración sea la adecuada, (por ejemplo en el caso de los tintos de consumo rápido, con maceraciones cortas).

Las uvas que no hayan llegado a la madurez tecnológica pueden eventualmente vinificarse y luego formar parte de cortes.

A continuación se presentan 3 ejemplos de evaluación:

Ejemplo 1	Puntos				Decisión
	1	2	3	4	
Madurez tecnológica			X		Uvas completamente maduras, aptas para producir un vino de gama alta. Siempre que el estado sanitario sea excelente
Madurez aromática de la pulpa			X		
Madurez aromática de la piel			X		
Madurez de los taninos			X		

Ejemplo 2	Puntos				Decisión
	1	2	3	4	
Madurez tecnológica				X	Uvas con buen equilibrio azúcar/ácido, pero no con madurez aromática o pelicular. Apto para dar un vino bien posicionado de gama media, si la vinificación es la apropiada (maceración corta por ejemplo)
Madurez aromática de la pulpa			X		
Madurez aromática de la piel		X			
Madurez de los taninos		X			

Ejemplo 3	Puntos				Decisión
	1	2	3	4	
Madurez tecnológica			X		Uva que no llega a madurez. Puede servir para elaborar vinos con poca estructura
Madurez aromática de la pulpa			X		
Madurez aromática de la piel		X			
Madurez de los taninos		X			

**Conclusión del método:**

El análisis sensorial de los granos de uva ofrece una herramienta interesante para tomar decisiones. Este método de evaluación se adquiere fácilmente con entrenamiento y permite:

- Ser utilizado como complemento de los controles de madurez (tenor azucarino, pH), para caracterizar mejor el nivel de madurez, sobre todo cuando la acumulación de azúcares se hace más lenta. Durante esta fase final de maduración el potencial aromático y el fenólico evolucionan rápidamente y la degustación de la uva es un método rápido.
- Caracterizar mejor el potencial cualitativo de la vendimia y realizar una primera evaluación del nivel cualitativo de los vinos a obtener.

Antes de la cosecha, el enólogo debe definir el vino a elaborar y no dejar de observar el estado del viñedo, su homogeneidad, su estado sanitario, hídrico, la presencia de malezas, el aspecto general, su nivel productivo y el equilibrio vegetativo-productivo. Será necesario elaborar fichas de identificación de cada viñedo y a partir de ahí organizar un programa de evaluación objetiva de la calidad potencial de cada viñedo.

## ABREVIATURAS O SIMBOLOS UTILIZADOS

Unidades:

- **cm**: centímetros
- **g**: gramos
- **g L<sup>-1</sup>**: gramos por litro.
- **gotas s<sup>-1</sup>**: gotas por segundo.
- **kg**: kilogramos
- **L**: litros
- **M**: solución molar o un mol por litro.
- **mg**: miligramos
- **mg L<sup>-1</sup>**: miligramos por litro
- **mg kg<sup>-1</sup>**: miligramos por kilogramo
- **m<sup>2</sup> kg<sup>-1</sup>**: metros cuadrados por kilogramo
- **mL**: mililitros
- **mm**: milímetros
- **m**: metros
- **N**: solución normal o equivalentes por litro
- **nm**: nanómetros (medida de longitud de onda)
- **N/50**: solución 1/50 normal o 1/50 equivalentes por litro
- **p.a.**= droga para análisis
- **ppm**: parte por millón equivalente a miligramos por litro o miligramos por kilogramo
- **qq**: quintales métricos (100 kg)
- **µm**: micrómetros
- **µL**: microlitros. Equivalencia : 1000 µL es igual a 1 mL.

Elementos minerales que aparecen en las fórmulas de sustancias químicas:

- **Cl**: cloro
- **Fe**: hierro
- **H**: hidrógeno
- **N**: nitrógeno
- **O**: oxígeno
- **S**: azufre

## BIBLIOGRAFÍA

- Amrani Joutei, K. y Glories, Y.; (1994). Étude en conditions modèles de l'extractibilité des composés phénoliques des pellicules et des pépins de raisins rouges. *J. Int. Sci. Vigne Vin*. 28, 4: 303-317.
- Amrani Joutei, K. y Glories, Y.; (1996). Isolement des protoplastes de pellicules de raisin et optimisation de leur rendement. *Jour. Intern. Sci. Vigne Vin*. 30, 1: 41-45.
- Asen, S.; Stewart, R.N. y Norris, K.H.; (1972). Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochem*. 11: 1139-1144.
- Auw, J. M.; Blanco, V.; O'Keefe, S.F. y Sims, C.A.; (1996). Effect of processing on the phenolics and colour of Cabernet Sauvignon, Chambourcin, and Noble wines and juices. *Am. J. Enol. Vitic*. 47: 279-286.
- Baranowski, E.S. y Nagel, C.W.; (1983). Kinetics of malvidin-3-glucoside condensation in wine model systems. *J. Food Sci*. 48: 419-429.
- Bate-Smith, E.C.; (1954). Astringency in Foods. *Food* 23: 124.
- Bate-Smith, E.C.; (1973). Haemanalysis of tannins: The concept of relative astringency. *Phytochem*. 12: 907-9.
- Bogs, J. Downey, M.O.; Harvey, J.S.; Ashton, A.R., Tanner, G.J. y Robinson, S.P. (2005). Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevines leaves. *Plant Physiology* 139: 652-663
- Boulton, R.; (1995). Red wines. en: *Fermented Beverage Production*. Lea, A.G.H., and Piggot, J.R. (Eds.), Blackie Academic and Professional, Chapman y Hall, London: 121-158.
- Boulton, R.; (1999a). Copigmentation in Pinot Noir Wines. *2nd Joint Burgundy-California-Oregon Winemaking Symposium*. UC Davis. Cooperative Extension.
- Boulton, R.; (1999b). El fenómeno de la copigmentación en los vinos tintos. *Seminario Internacional "Hacia la Enología del Siglo XXI"*, INTA y Facultad de Ciencias Agrarias, UNCuyo, Argentina.
- Boulton, R.; (2001). The Copigmentation of Anthocyanins and its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review. *Am. J. Enol. Vitic*. 52:2: 67-87.
- Brouillard, R. y Delaporte, B.; (1977). Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside. *J. Am. Chem. Soc*. 99: 8461-8468.
- Brouillard, R.; Mazza, G.; Saad, Z.; Albrecht-Gray, A.M. y Cheminat, A.; (1989). The copigmentation reaction of anthocyanins: A microprobe for the structural study of aqueous solutions. *J. Am. Chem. Soc*. 111:2604-2610.
- Brouillard, R. y Lang, J.; (1990). The hemiacetal-cis-chalcone equilibrium of malvin, a natural anthocyanin. *Can. J. Chem*. 68:755-761.
- Brossaud, F.; (1999). Composition en flavonoïdes des baies et des vins de \*Vitis vinifera\* var. Cabernet franc. Etude des descripteurs analytiques et sensoriels en relation avec l'effet terroir en moyenne Vallée de la Loire. *Rennes, France, L'Ecole Nationale Supérieure Agronomique*, 1999: 344: 56.

Brossaud, F.; Cheynier, V. y Noble, A.C.; (2001). Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 7 (1): 33-39.

Cheynier, V.; Moutounet, M. y Sarni-Manchado, P.; (1998). Les composés phénoliques. En *Oenologie, fondements scientifiques et technologiques. C. Flanzy, Paris, Lavoissier Tec-&Doc (Eds: 124-164)*.

Cravero, M. C. Y Bosso, A.; (1996). Incidenza della durata di macerazione e del tenore in etanolo sull'estrazione dei polifenoli durante la macerazione. *Quaderni della Scuola di Specializzazione in Viticoltura ed Enologia, Univ. Torino*. Italy, 1996, (20): 17-43.

Dangles, O.; Saito, N. y Brouillard, R. (1993). Anthocyanin intramolecular copigment effect. *Phytochem*. 34: 119-124.

Davies, A.J. y Mazza, G.; (1993). Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds. *J. Agric. Food. Chem*. 41: 716-720.

Dacey, M.; (1996). The Effect of Cold Maceration With and Without Sulphur Dioxide on Pinot Noir Wine. *M. Appl. Sci. Thesis, Lincoln University, New Zealand*.

Doco, T.; Williams, P.; Moutounet, M. y Pellerin, P.; (2000). Les polisaccharides du vin. *Bulletin de l'I.O.I.V. (837-838): 785-792*.

Downey, M.O.; Harvey, J.S. y Robinson S. P.; (2003). Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 9: : 15-27.

Frigerio, H.; (1986). Relación entre la lectura refractométrica y los azúcares reductores. *Boletín del INV N°37: 10-18*. ISSN: 325-6766

Furtado, P.; Figueiredo, P.; Chaves das Neves, H. y Pina, F.; (1993). Photochemical and thermal degradation of anthocyanins. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem*. 75: 113-118.

Glories, I.; (1999). La maturità fenolica delle uve: primo parametro da controllare per una corretta vinificazione in rosso. *Vignevini* 3: 46-53.

González-Neves, G.; (2005). Etude de la composition polyphénolique des raisins et des vins des cépages Merlot, Cabernet-Sauvignon et Tannat provenant de vignes conduites en Lyre et en Espalier dans le sud del'Uruguay. Thèse. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier. Montpellier: 279.

González-Neves, G.; Ferrer, F.; Moutounet, M.; Carbonneau, A.; (2007). Predicción de la composición fenólica y el color de los vinos tintos de acuerdo con el potencial polifenólico de la uva. XXX Congress of vine and wine de la OIV. Budapest.

Harbertson J.F., Kennedy J. A. and Adams, D.O.; (2002). Tannin in skin and seeds of Cabernet sauvignon, Syrah and Pinot noir berries during ripening. *American Journal of Enology and Viticulture* 52 (1): 54-59.

Haslam, E.; (1980). In *Vino Veritas: Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines*. *Phytochem*. 19:2577-2582.

Hoshino, T.; (1991): An approximate estimate of self-association constants and the self-tacking conformation of malvin quinoidal bases studied by <sup>1</sup>H NMR. *Phytochem*. 30: 2049-2055.

Hoshino, T.; (1992): Self-association of flavylum cations of anthocyanidin 3,5-diglucosides studied by circular dichromism and <sup>1</sup>H NMR. *Phytochem*. 31: 647-653.

Kantz, K. y Singleton, V.L.; (1991). Isolation and determination of polymeric polyphenols in wines using Sephadex LH-20. *Am. J. Enol. Vitic*. 42: 309-315.

Keller, M.; (2009) *Grapevine anatomy and physiology*. Editorial Washington State University: 156.

Kong, J.M.; Chiam, L.S.; Goh, N.K.; Chia, T.F. and Brouillard, R.; (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64: 923-933.

Kovac, V.; Alonso, E.; Bourzeix, M. y Revilla, E.; (1992). Effect of several enological practices on the content of catechins and proanthocyanidins of red wines. *J. Agric. Food. Chem*. 40: 1953-1957.

Lee, T.; Hin, M.; Ough, C. y Berg, H.; (1977). Effects of fermentation variables on the color and sensory quality of Pinot Noir wines. *Proc. 3rd Aust. Wine Ind. Tech. Conference*. Albany: 77.

Leguizamón, Graciela del Valle; León, Alberto González y Sañudo Reginaldo Báez; (2005). Antocianinas en uva (*Vitis vinifera* L.) y su relación con el color. *Rev. Fitotec. Mex*. Vol 28 (4): 359-368.

Matthews, M.A. y Anderson, M.M.; (1988). Fruit ripening in *Vitis vinifera* L. Responses to seasonal water deficits. *Am.J.Enol.Vitic*. Vol.39(4): 313-320.

Maury, C.; Sarni-Manchado, P.; Lefevre, S.; Ceynier, V. y Moutounet, M.; (2001). Influence of Fining with Different Weight Gelatins on Proanthocyanidin Composition and Perception of Wines. *Am. J. Enol. Vitic*. 52 (2): 140-145.

Mazza, G. y Brouillard, R.; (1987). Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food. Chem*. 25: 207-225.

Mazza, G. y Brouillard, R.; (1990). The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochem*. 29: 1097-1102.

Mazza, G.; (1995). Anthocyanins in grapes and grape products. *Crit. Rev. Food Sci. Nut*. 35: 341-371.

McMurrough, I. y McDowell, J.; (1978). Chromatographic separation and automated Analysis of flavanols. *Analytical Biochemistry* 91: 92-100.

Merida, J.; Moyano, L.; Millan, C. y Medina, M.; (1991). Extraction of phenolic compounds in controlled macerations of Pedro Ximenez grapes. *Vitis* 30: 117-127.

Merlin, J.; Statou, A. y Brouillard, R.; (1985). Investigation of the in vivo organisation of anthocyanins using resonance raman microspectrometry. *Phytochem*. 24. 7: 1575-1581.

Moutounet, M.; Rigaud, J.; Souquet, J.M. y Ceynier, V.; (1996). Caractérisation structurale des tanins de la baie de raisin. *Bulletin de l'I.O.I.V.*, 783-784: 433-443.

Moutounet, M.; (2000). *Apuntes del Curso de Tecnología Enológica. Maestría de Viticultura y Enología, FCA-UNCuyo, ENSA-Montpellier, INTA Mendoza*. Argentina.

Neill, S.O.; Gould, K.S.; (2003). Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants. *Functional Plant Biol*. 30: 865-873.

Noble, A.C.; (1990). Bitterness and astringency in wine. en: Rouseff, R. L. (Ed.): *Bitterness in Foods and Beverages*. Ed. Developments in Food Science. USA.

Ojeda, H.; (1999). Influence de la contrainte hydrique sur la croissance du péricarpe et sur l'évolution des phénols des baies de raisin (*Vitis vinifera* L.) cv. Syrah. Thèse de Doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier.

Oszmianski, J.; Romeyer, F.M.; Sapis, J.C. y Macheix, J.J.; (1986). Grape seed phenolics: Extraction as affected by some conditions occurring during wine processing. *Am. J. Enol. Vitic*. 37:7-12.

Parley, A.; (1997). The Effect of Pre-fermentation Enzyme Maceration on Extraction and Color Stability in Pinot Noir. Thesis submitted for the degree of Ms. Sci. Lincoln University. New Zealand.

Peleg, H.; Gacon, K.; Schlich P. y Noble, A. C.; (1999). Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79: 1123-1128.

Peynaud, E.; (1984). *Knowing and Making Wine*. John Wiley & Sons, New York.

Price, S.F.; Breen, P.J.; Valladao, M. y Watson, B.T.; (1995a). Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 187-194.

Price, S.F.; Watson, B.T. y Valladao, M.; (1995b). Vineyard and winery effects on wine phenolics - flavanols in Oregon Pinot noir. en: *Proceedings of the Ninth Australian Wine Industry Technical Conference, Adelaide*. Stockley, C.S., Sas, A.N., Johnstone, R.S., and Lee, T.H.(Eds.): 93-97.

Porter, L; Hrstich, L.; Chan, B.; (1986). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 25: 223-230

Ramey, D.; Bertrand, A.; Ough, C.S.; Singleton, V.L. y Sanders, E.; (1986). Effects of skin contact temperature on Chardonnay must and wine composition. *Am. J. Enol. Vitic.* 37: 99-106.

Ribéreau-Gayon y Stonestreet, (1965). Le dosage des anthocyanes dans les vins rouges P - *Bulletin de la Société Chimique de France*, Paris: 2649-2652

Ribéreau-Gayon, P.; (1982). The Anthocyanins of Grapes and Wines, en: *Anthocyanins as Food Colours*. Editado por P. Markakis, Academic Press, New York: 209-243.

Ribéreau-Gayon, P.; Pontallier, P. y Glories, Y.; (1983). Some interpretations of colour changes in young red wines during their conservation. *J. Sci. Fd. Agric.* 34: 505-516.

Ribéreau-Gayon, Glories Y.; Mavjean, A.; Dubourdieu, D; (2002). *Tratado de Enología Tomo II. Química del vino, estabilización y tratamiento de los vinos*. Editorial Hemisferio Sur.

Riou, V. and Asselin, C.; (1996). Potentiel Polyphénolique Disponible Du Raisin, Estimation Rapide Par Extraction Partielle A Chaude. *Progrès Agricole et Viticole*, 113 N° 18 : 382-384.

Sarni-Manchado, P.; Cheynier, V. y Moutounet, M.; (1999a). Interactions of grape seed tannins with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistr.* 47(1): 42-47.

Sarni-Manchado, P.; Deleris, A.; Avallone, S.; Cheynier, V. y Moutounet, M.; (1999b). Analysis and Characterization of Wine Condensed Tannins Precipitated by Proteins Used as Fining Agent in Enology. *Am. J. Enol. Vitic.* 50(1): 81-86.

Saucier, C.; (1997). Les tanins du vin: Etude de leur stabilité colloïdale. *Thesis, Université Bordeaux II, Francia*.

Saucier, C.; Glories, Y. y Rous, D.; (2000). Interactions tanins-colloïdes: nouvelles avances concernant la notion de bons et mauvais tanins. *Rev. Oenol.* 94: 9-10.

Schmidt, J.O. y Noble, A.C.; 1983. Investigations of the effect of skin contact time on wine flavour. *Am. J. Enol. Vitic.* 34: 135-138.

Scudamore-Smith, P.D.; Hooper, R.L. y McLaren, E.D.; (1990). Colour and phenolic changes of Cabernet Sauvignon wine made by simultaneous yeast/bacterial fermentation and extended pomace contact. *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 57-67.

Sims, C.A. y Bates, R.P.; (1994). Effects of skin fermentation time on the phenols, ellagic acid sediment and sensory characteristics of a red *Vitis rotundifolia* wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 45: 56-62.

Singleton, V.L. y Draper, D.E. ; (1964). The transfer of polyphenolic compounds from grape seeds into wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 45: 34-40.

Somers, T.C. y Evans, M.E.; (1974). Wine quality: Correlations with colour density and anthocyanin equilibria in a group of young red wines. *J. Sci. Fd. Agric.* 25: 1369-1379.

Somers, T.C. y Evans, M.E.; (1977). Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO<sub>2</sub>, and "chemical age". *J. Sci. Fd. Agric.* 28: 279-287.

Somers, T.C. y Evans, M.E.; (1979). Grape pigment phenomena: Interpretation of major colour losses during vinification. *J. Sci. Fd. Agric.* 30: 623-633.

Somers, T.C. y Westcombe, L.G.; (1982). Red wine quality: The critical role of SO<sub>2</sub> during vinification and conservation. *Aust. Grapegrow. Winemaker* 220: 68-74.

Somers, T.C. y Evans, M.E.; (1986). Evolution of red wines I. Ambient influences on colour composition during early maturation. *Vitis* 25: 31-39.

Somers, T.C. y Verette, E.; (1988). Phenolic Composition of Natural Wine Types en: *Modern Methods of Plant Analysis, Wine Analysis*. Linskens, H.F., and Jackson, J.F., Eds., Springer-Verlag, Berlin: 219-257.

Timberlake, C.F. y Bridle, P.; (1967). Flavylum salts, anthocyanidins and anthocyanins II. Reactions with sulphur dioxide. *J. Sci. Fd. Agric.* 18: 479-485.

Timberlake, C.F. y Bridle, P.; (1976). Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 27: 97-105.

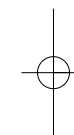
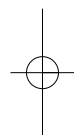
Walker, R.R.; Blackmore, D.H.; Clingeffer, P.R., Kerridge, G.H.; Ruhl, E.H., Nicholas P.R.; (2005). Shiraz berry size in relation to seed number and implications for juice and wine. *Australian Journal of grape and wine research*. Vol 11 (1): 2-8.

Waterhouse, A.; Ignelzi, S.; Shirley, J.; (2000). A comparison of methods for quantifying oligomeric proanthocyanidins from grape seed extracts. *Am. J. Enol. Vitic.* Vol 51 (4): 383-389.

Wulf, L.W. y Nagel, C.W.(1978). High-Pressure liquid chromatographic separation of anthocyanins of *Vitis vinifera*. *Am. J. Enol. Vitic.* 29: 42-49.

Zironi, R., Buiatti, S. y Celotti, E.; (1992). Evaluation of a new colorimetric method for the determination of catechins in musts and wines. *Die Wein-Wissenschaft* 1: 1-7

Zoecklein, B.(1991). An overview of maceration during red winemaking. *Aust. & N.Z. Wine Ind. J.* 6: 265-267.



Se terminó de imprimir  
el 19 de febrero de 2010,  
en los Talleres Gráficos de  
Inca Editorial Cooperativa de Trabajo Ltda.  
José Federico Moreno 2164/2188  
(5500AXF) Mendoza - República Argentina.  
Telefax 0261 4259161- 4290409  
e-mail: [incasterio@incaeditorial.com](mailto:incasterio@incaeditorial.com)  
[www.incaeditorial.com](http://www.incaeditorial.com)