



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE ESTABILIZANTES ZENITH WHITE® Y
ZENITH COLOR® SOBRE LA FRACCIÓN ÁCIDA Y OTROS
PARÁMETROS HABITUALES EN VINOS BLANCOS Y TINTOS.**

MÁSTER EN ENOLOGÍA

VALENCIA, JULIO 2020

ALUMNA: IRENE RODRÍGUEZ SOTO

TUTORA ACADÉMICA: PILAR ARAGÓN REVUELTA

RESUMEN

El interés por tener un conocimiento más amplio de las características del vino, hace que aumente la cantidad de técnicas o métodos que permiten cuantificar la composición y características de los mismos, controlando así un seguimiento en la calidad de los mismos.

La utilización de distintos estabilizantes en un vino, puede aportar una diferenciación en sus características, modificando incluso la calidad y/o características, por lo que, en este trabajo, se comparan distintos métodos estabilizantes sobre muestras de vino blanco y tinto de la comarca de Los Serranos, estudiando el efecto de estas prácticas sobre los parámetros más relevantes. Se determina su estabilidad, índice de polifenoles totales, intensidad colorante y características generales. También se determina la composición de la fracción ácida mediante electroforesis capilar por lo que es necesario poner a punto el método previamente. Finalmente, se tratan los resultados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA). Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas en la fracción ácida.

PALABRAS CLAVE: estabilizante, electroforesis capilar, fracción ácida.

ABSTRACT

Nowadays, the interest in having a broader knowledge of the characteristics of the wine increases the number of techniques or methods that allow the composition and characteristics of the same to be quantified, thus controlling a monitoring of their quality.

The use of different stabilizers in a wine, can contribute to a differentiation in its characteristics, even modifying the quality and/or characteristics. This is the reason why, in this work, different stabilizing methods are compared on samples of white and red wine from the region of Los Serranos studying the effect of these practices on the most relevant parameters. Its stability, total polyphenol index, coloring intensity and general characteristics are determined. At the same time, the composition of the acid fraction is also determined by capillary electrophoresis, so it is necessary to previously set up the method. Finally, the results are treated statistically using an analysis of variance (ANOVA). The results obtained show significant differences in the acid fraction.

KEY WORDS: stabilizer, capillary electrophoresis, acid fraction.

Índice de tablas:

- Tabla 1. Valores estabilidad en vino.	5
- Tabla 2. Muestras vino.	16
- Tabla 3. Estabilidad en muestras de vino blanco.	22
- Tabla 4. Estabilidad en muestras de vino tinto.	23
- Tabla 5. Índice polifenoles totales en muestras de vino blanco.	25
- Tabla 6. Índice polifenoles totales en muestras de vino tinto.	25
- Tabla 7. Características cromáticas en muestras de vino blanco.	26
- Tabla 8. Características cromáticas en muestras de vino tinto.	27
- Tabla 9. Características generales en muestras de vino blanco.	28
- Tabla 10. Características generales en muestras de vino tinto.	28
- Tabla 11. Parámetros de calidad del método: ecuación de la recta calibrado (sensibilidad), coeficiente de regresión, LD, LQ.....	29
- Tabla 12. Concentración media de ácidos en cada muestra de vino blanco.	31
- Tabla 13. Concentración media de ácidos en cada muestra de vino tinto.	32

Índice de figuras:

- Figura 1. Esquema de un equipo de Electroforesis Capilar.	10
- Figura 2. Equipo Tartarcheck: medidor de estabilidad tartárica en vinos.	14
- Figura 3. Procedimiento de preparación de muestras para la realización de disolución de calibrado.	18
- Figura 4. Procedimiento de preparación de muestras de vino.	18
- Figura 5. Gráficos de estabilidad de muestras de vino blanco.	22
- Figura 6. Gráficos de estabilidad de muestras de vino tinto.	24
- Figura 7. Gráfico de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, entre los distintos tratamientos para el Sulfato.	31
- Figura 8. Gráfico de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, entre los distintos tratamientos para el Tartárico.	32

Abreviaturas:

- ZW: Zenith White ®	- UV: ultravioleta
- ZC: Zenith Color ®	- CE: electroforesis capilar
- CMC: carboximetilcelulosa	- AV: acidez volátil
- PA: poliaspartato	- AT: acidez total
- KPA: poliaspartato de potasio	- G+F: glucosa + Fructosa
- H ₂ T: ácido tartárico	- PI: patrón interno
- T ²⁻ : ión tartrato	- LQ: límite de cuantificación
- HT: ion bitartrato	- LD: límite de detección
- THK: bitartrato potásico	- IPT: índice de polifenoles totales
- CaT: tartrato cálcico	- IC: intensidad colorante
- n: número de muestras	- T: tonalidad

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Qué es el vino.	1
1.2 Procesos de elaboración.	2
1.3 Procesos de estabilización.	4
1.4 Influencia de los procesos de estabilización.	5
1.5 Análisis de ácidos orgánicos.	6
1.6 Determinación de la fracción acida – Método de electroforesis capilar.	8
1.7 Determinación del color.	11
2. OBJETIVOS.	13
3. MATERIAL Y MÉTODOS	14
3.1. Materiales	14
3.2. Métodos	16
3.3. Análisis estadístico	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	21
4.1. Estabilidad	21
4.2 Índice de Polifenoles Totales	24
4.3 Intensidad colorante y tonalidad	26
4.4 Características generales.	28
4.5 Determinación de ácidos orgánicos	29
5. CONCLUSIONES	35
6. BIBLIOGRAFÍA	36
7. ANEXO	39

1. INTRODUCCIÓN

Según la normativa española, el vino es el alimento natural obtenido exclusivamente por fermentación alcohólica, total o parcial, de uva fresca, (estrujada o no), o de mosto de uva (Ley 24/2003, de 10 de julio, de la Viña y del Vino.) [1]

En el vino se encuentran distintos componentes, procedentes de la propia uva, siendo resultado de la actividad biológica o de reacciones químicas. Gracias a la acción metabólica de las levaduras se produce la fermentación, transformándose los azúcares de la uva en etanol y CO₂. Dicha fermentación se desarrolla utilizando los ácidos y azúcares de la uva, aunque influyen otros factores como el clima, la región, topología, luminosidad... [2].

Es importante tener un seguimiento de los parámetros del vino, para ello contamos con una gran cantidad de técnicas disponibles para llevar a cabo los análisis correspondientes en el vino, como cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), espectrofotometría de masas, cromatografía de gases, análisis enzimáticos... Estas técnicas permiten cuantificar la composición en los vinos, calidad de uva, mosto, vino y caracterizarlos. Por ello, los avances instrumentales, la automatización y la modernización en el control y adquisición de señales de los instrumentos, nos permiten obtener una gran cantidad de información analítica, minimizando el tiempo, mejorando así el desarrollo de nuevos métodos.[2]

1.1 Qué es el vino.

El vino es una bebida alcohólica elaborada por fermentación del mosto de uvas, originada por la acción de microorganismo vivos (levaduras). La variedad de uva de la que descienden la mayoría para la elaboración de vinos es la '*Vitis Vinifera*'. [3]

En el vino, encontramos una mezcla de compuestos que se encuentran en diferentes concentraciones como agua, etanol, glucosa, ácidos orgánicos, minerales, compuestos fenólicos... Estas concentraciones dependen de factores como el clima, el suelo, procesos de elaboración... [2]

A continuación, se muestra la distinta composición del vino:

- 1) *Agua*: es el componente mayoritario, siendo casi un 85%, agua biológica pura, desde el punto de potabilidad y bacteriológico. En esta agua se encuentran disueltas todas las sales minerales, microelementos y oligoelementos que la vid toma del suelo durante su proceso de crecimiento.
- 2) *Etanol*: representa un 10 -15% de la composición del vino, siendo el segundo componente desde el punto de vista cuantitativo. Se origina por la fermentación de los azúcares de la uva (glucosa

y frutuosa). Actúa como soporte de los componentes aromáticos del vino, tiene un ligero sabor dulce.

- 3) *Glicerina y/o glicerol*: es el tercer componente de los vinos. Tiene sabor ligeramente dulce y contribuye al vino cuerpo, consistencia y suavidad.
- 4) *Sustancias volátiles y aromáticas*: son los componentes de aroma y bouquet de los vinos. En la actualidad hay identificados alrededor de 500 sustancias como componentes de aroma. Fundamentalmente pertenecen a cuatro familias: ácidos, alcoholes, aldehídos, ésteres.
 - 4a. *Otros alcoholes*: (propanol, metanol, isobutanol, sorbitol, feniletanol). En concentraciones inferiores a 1 g/L se encuentran otros alcoholes cuyo número es muy elevado, dando lugar a la formación de ésteres que participan en el aroma de los vinos.
 - 4b. *Ácidos*: debemos distinguir entre los ácidos que ya se encontraban en la uva, dando lugar a acidez fija (ácido tartárico, málico y cítrico) y los originados en la fermentación, que dan lugar a la acidez volátil (ácido láctico, succínico y acético)
- 5) *Compuestos fenólicos*: responsables de proporcionar a los vinos su color, sabor astringente y amargo, cuerpo, suavidad y aromas
- 6) *Vitaminas*: tiamina, riboflavina, nicotinamida, ácido pantoténico... [4], [5]

1.2 Procesos de elaboración.

El proceso de obtención del mosto para iniciar el proceso de fermentación se podría resumir en cuatro etapas:

- *Vendimia*: una vez que la uva ha alcanzado la maduración deseada se realiza la recogida de la uva. Es importante realizar una selección del fruto sano separándolo del dañado.
- *Transporte a la bodega*: debe realizarse de la forma menos agresiva, evitando que el grano de uva sufra presiones y se rompa, provocando fermentaciones tempranas.
- *Descarga*: se realiza sobre la tolva de recepción, que después será transportada a la estrujadora. En la tolva se analiza el fruto para determinar su estado sanitario y los diferentes análisis.
- *Estrujado*: la estrujadora rompe por presión el grano, pero lo justo para que no se rompan las partes duras del racimo (pepitas, raspones y hollejos). La pasta viscosa resultante se trasladada mediante diversos métodos a las prensas, evitando que entre en contacto con el aire para evitar una fermentación prematura.

A partir de aquí el proceso de elaboración sigue distintos pasos según el tipo de vino a elaborar:

Vinos blancos.

- *Separación de mostos:* tras el prensado la pasta con el hollejo y el raspón, se deja escurrir y se van realizando diferentes presiones, obteniéndose mostos de distinta calidad. Cada una de estas calidades fermentará por separado dando lugar a diferentes tipos de vino.
- *Desfangado:* para eliminar las partículas sólidas en suspensión se dejan reposar los mostos durante un tiempo para que se vayan depositando, por decantación, en el fondo del depósito.
- *Fermentación:* es el proceso por el cual los azúcares que contiene el mosto se transforman en alcohol, por acción de las levaduras.
- *Trasiegos:* para eliminar los restos sólidos procedentes de la fermentación se pasa el vino de un recipiente a otro. Después se seleccionan los vinos según las calidades.
- *Clarificación:* mediante unas sustancias clarificantes se arrastran al fondo del recipiente los restos sólidos que todavía hayan quedado en el vino. Más tarde se puede realizar el filtrado, para eliminar posibles materias en suspensión.
- *Embotellado:* el vino se embotella para su comercialización.

Hay que tener un control de la temperatura de fermentación. La fermentación se desarrolla en dos fases, una tumultuosa y otra rápida, y dura normalmente entre 10 y 15 días. Según el contenido de azúcar se distingue entre: vino seco, semiseco, dulce.

Vinos tintos.

La elaboración de los vinos tintos se realiza a partir del mosto de uvas tintas que no han fermentado junto con las partes sólidas de la uva (hollejo y pepitas). El proceso es el siguiente:

- *Despalillado:* la pasta resultante del estrujado se lleva a un depósito donde se separa el grano del raspón para que durante la maceración no se transmitan olores y sabores herbáceos desagradables.
- *Fermentación:* los azúcares se desdoblán en alcohol y desprenden anhídrido carbónico mientras las materias colorantes del hollejo se disuelven en el mosto.
- *Maceración / extracción de color:* en el depósito de fermentación se encuentran las partes sólidas y líquidas: el mosto en la parte inferior, y las pieles y pepitas en la superior, formando el sombrero. Para conseguir la extracción de color necesaria se pueden realizar remontado, bazuqueo o delestaje

- *Descube*: una vez conseguido el color en la maceración, el líquido se trasiega a otro depósito separándolo de las materias sólidas.
- *Fermentación maloláctica*: en esta se transforma el ácido málico, fuerte y vegetal, en otro más suave y untuoso, el láctico, que confiere al vino finura y suavidad.
- *Trasiegos*: una vez finalizadas las fermentaciones, el vino se somete a diversos trasiegos y tratamientos de clarificación y estabilización. Se selecciona por calidades y embotellados en el caso de los jóvenes, o se pasan a barricas para la crianza en madera. [5]

1.3 Procesos de estabilización.

El tratamiento de los vinos antes del embotellado para evitar la precipitación de las sales y cualquier resto sólido es un paso importante y común durante la producción del vino. La estabilización en frío es el tratamiento de estabilización más extendido y utilizado hoy día por las bodegas para alcanzar la estabilización tartárica del vino. Aunque la estabilización en frío ha demostrado ser efectiva, presenta algunas desventajas significativas, como el tiempo de tratamiento necesario, el alto costo económico de la técnica, la pérdida de materia colorante y compuestos responsables del aroma y sabor de los vinos, y los problemas ambientales por los residuos que se generan. Estas son las razones por las cuales se están introduciendo otros productos y metodologías en las bodegas.

Otros tratamientos extendidos en la actualidad que insolubilizan y eliminan los tartratos del vino, son la ósmosis inversa, sistemas que impiden las precipitaciones tartáricas a través de coloides protectores o inhibidores de la cristalización (CMC, manoproteínas y ácido metatartárico), y técnicas que eliminan los cationes de potasio responsables de las precipitaciones (electrodialisis, intercambiador catiónico...).

Estas técnicas además de eliminar el problema de la precipitación tartárica, pueden eliminar compuestos favorables para el vino como son aromas y polifenoles modificando por lo tanto las características organolépticas del vino, por este motivo es necesario profundizar en estas técnicas para mejorar la calidad del vino tras un proceso de estabilización tartárica.[6]

En los últimos años se está generalizando el empleo de aditivos basados en la solución a base de poliaspartato de potasio como Zenith White® (ZW) para vino blanco y Zenith Color® (ZC) para vino tinto, y por ellos resulta relevante estudiar el efecto sobre la calidad del vino [7].

- Medida de la estabilidad – Test de Boulton

El test de conductividad, también llamado Test de Boulton, nos da una información de la medida de estabilidad tartárica en los vinos mediante la conductividad antes y después de provocarle una

sobresaturación de sales. Esta variable depende de las sales disueltas presentes en el líquido. El fundamento se basa en una precipitación rápida de los cristales de tartrato y ácido de potasio, que se hallan sobresaturados en el vino, siguiendo la disminución del potasio por un método conductimétrico. [8].

La medida de dicha estabilidad se puede llevar a cabo mediante el equipo Tartarcheck (Exacta Wine&Beverage), que relaciona la conductividad tras la adición de bitartrato potásico con la estabilidad para cada tipo de vino, como se recoge en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores estabilidad en vino.

ESTABILIDAD	VINO BLANCO (μS)	VINO TINTO (μS)
Muy estable	<30	<40
Estable	30 – 50	40 – 60
En riesgo	50 – 70	60 – 80
Inestable	>70	>80

1.4 Influencia de los procesos de estabilización.

Los distintos procesos de estabilización pueden influir en la composición y características organolépticas del vino. Anteriormente ya hemos mencionado distintos procesos y tratamientos a utilizar, que explicamos a continuación.

Entre los procesos aditivos, encontramos la carboximetilcelulosa (CMC), el poliaspartato de potasio (PA), y goma arábiga, cuyo uso ha sido recientemente aprobado por la OIV. Estos compuestos inhiben la cristalización del ácido tartárico.

La carboximetilcelulosa (CMC) o goma de celulosa es un polisacárido que se obtiene como celulosa modificada a partir de células vegetales. Los polímeros obtenidos tienen diferente solubilidad dependiendo del grado de polimerización y de sustitución, constituyendo disoluciones más o menos viscosas. La solubilidad en agua es baja y es insoluble en etanol por lo que en el vino es poco soluble dificultando así la dosificación del producto y las operaciones de limpieza [9]. Su mecanismo de acción es todavía objeto de estudio, pero se conoce que, debido a su estructura molecular, la CMC, se une a la superficie del bitartrato potásico disuelto impidiendo el crecimiento de cristales por lo que actúa como un coloide protector. Su ventaja es su bajo coste y que no es sensible a la temperatura. No obstante, también se han encontrado inconvenientes con respecto al uso de la CMC, por ejemplo, que no puede ser utilizada en vinos tintos dado que precipita en presencia de taninos [7], [9], [10].

La goma arábica tiene poder estabilizante frente a precipitaciones de materia colorante, quiebras férricas, cúpricas y proteicas, siendo un coloide protector. La goma arábica está caracterizada por mejorar las características organolépticas de vinos ácidos o tánicos. Además, minimiza el pardeamiento y la conservación de los vinos blancos, expuestos a condiciones oxidativas [10], [11].

Como hemos mencionado anteriormente, el uso de aditivos basados en la disolución a base de poliaspartato de potasio se está extendiendo y encontramos Zenith White® para vino blanco y Zenith Color® para vino tinto [7]. El poliaspartato de potasio (PA) es un polímero obtenido por condensación del ácido aspártico, completamente biodegradable, que inhibe la formación de cristales de tartrato, por adsorción de las moléculas del polímero en los sitios activos de crecimiento de la matriz del cristal. Esto conduce a una nucleación y crecimiento reducidos y a la formación de estructuras cristalinas distorsionadas [7] [12].

Para el vino blanco, se utiliza Zenith White®, una disolución de poliaspartato de potasio A-5D K/SD (KPA), carboximetilcelulosa sódica (CMC), goma arábica, dióxido de azufre ($0.3 \pm 0.1\%$) y agua desmineralizada. Entre sus características encontramos su efectividad duradera, la mejora de la calidad del vino aumentando el volumen, suavidad y frescura aromática y conlleva un menor consumo de agua, gasto energético y menor producción de gases CO₂ de efecto invernadero siendo medioambientalmente sostenible. Ninguno de sus componentes tiene efecto colmatante por lo que pueden ser añadidos antes de ser filtrados. [13]

Para el vino tinto, se utiliza Zenith Color®, (disolución de poliaspartato de potasio A-5D K/SD (KPA), goma arábica Verrek, dióxido de azufre ($0.3 \pm 0.1\%$), agua desmineralizada). El poliaspartato de potasio impide la formación y crecimiento de cristales de bitartrato de potasio, previniendo su precipitación en la botella, mientras que la goma Arábica Verrek previene la precipitación del color. Como con el Zenith White® mejora también la calidad del vino aumentando el volumen del vino, suavidad y frescura aromática y conlleva un menor consumo de agua, gasto energético y menor producción de gases CO₂ de efecto invernadero. Sus componentes reducen el efecto colmatante, permitiendo la adición del producto antes de ser filtrado. [14].

1.5 Análisis de ácidos orgánicos.

Los ácidos orgánicos son un importante contribuyente al sabor y aroma del vino y cada uno de estos ácidos contribuye de manera diferente a la acidez total del vino, y cada uno también tiene un sabor específico y único. También se sabe que contribuyen, directa o indirectamente, al color del vino y la estabilidad.

El sabor ácido del vino es imprescindible, pues, junto con los polifenoles, contrarresta el sabor dulce del etanol. El sabor ácido depende tanto de la acidez total como del pH. Los ácidos intervienen no sólo a través de los iones H^+ que emiten, sino también a través de su molécula completa, dando así un propio sabor en cada ácido. [15]

Hasta día de hoy, el enfoque se ha centrado principalmente en ácidos orgánicos derivados de la uva o en la transformación del ácido málico a ácido láctico por las bacterias del ácido láctico, ya que estos ácidos contribuyen significativamente a la acidez total final de vino, sin embargo, cada ácido tiene un sabor propio [16].

A continuación, se muestra cómo influyen estos ácidos en la acidez, y la importancia del ácido tartárico en la estabilidad, la cual es un parámetro estudiado.

- **Contribución a la acidez.**

Los ácidos orgánicos mayoritarios en el mosto son tartárico, málico y cítrico, representando alrededor del 90% de los constituyentes ácidos del mosto, siendo los que contribuyen en mayor proporción a la acidez valorable del vino, es decir la acidez total.

De la misma manera que la concentración de azúcares está íntimamente relacionada con la maduración, lo están el pH y la acidez, pero en este caso de manera inversamente proporcional, ya que van disminuyendo conforme avanza la etapa de maduración del fruto. La variación del pH podría afectar a otras características como el aroma, la estabilidad del color o la facilidad para extraer antocianos. Además, la acidez valorable se ve influenciada por la concentración de diferentes tipos de ácidos, de la concentración de potasio y del pH, por lo que es normal que cuando varíe uno de estos tres parámetros, la acidez total (expresada como ácido tartárico) se vea influenciada [17].

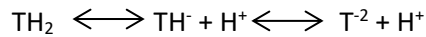
En la mayoría de los casos, los ácidos de la uva no se ven afectados por fermentación alcohólica, aunque se ha estudiado que el ácido málico en particular puede verse afectado por el proceso posterior de fermentación maloláctica. Sin embargo, la levadura libera un número de ácidos orgánicos adicionales durante y después de la fermentación, lo que origina cambios en el sabor final y una acidificación general del vino. Éstos son ácido succínico, acético, pirúvico y láctico [15], [18].

Ocurre una disminución de la acidez paralelamente a la acumulación de azúcar, por lo que los ácidos disminuyen durante la maduración. Los más importantes, tartárico y málico, son destruidos por la respiración de las células, por lo que se pierden en la madurez [19]. El ácido cítrico produce una sensación de frescor, mientras que el ácido tartárico y málico son más duros y verdes, aunque el málico puede llegar a ser metálico.

Los ácidos formados en la fermentación, dan una sensación agria como el acético, mientras que el succínico produce una mezcla entre el salado y el amargo. El ácido láctico se considera poco ácido, debido a la fermentación maloláctica, dando lugar a un vino más cremoso y suave [20].

- **Importancia del ácido tartárico a la estabilidad del vino.**

El ácido tartárico es un ácido débil que al pH del vino se encuentra parcialmente disociado según el siguiente equilibrio:



La proporción de cada una de las tres especies (H_2T , HT^- y T^{2-}) depende del pH, de la temperatura, de la concentración de otros iones (fuerza iónica) y del contenido en etanol del medio.

El ácido tartárico es uno de los ácidos naturales mayoritarios de los vinos y es capaz de combinarse con los cationes calcio y potasio presentes en la uva. Esta combinación da lugar a las sales correspondientes, bitartrato potásico y tartrato cálcico (CaT). Estas sales, son solubles en el mosto de uva, pero se vuelven cada vez más insolubles por la presencia de etanol en la fermentación alcohólica y durante el posterior almacenamiento del producto embotellado a bajas temperaturas [7], [21].

El ion bitartrato (HT^-), es el mayor responsable de las precipitaciones que se producen durante la fermentación del mosto y posteriormente en el vino, debido a que es muy poco soluble en una disolución hidroalcohólica [7].

Espontáneamente, el bitartrato potásico sedimenta, generando cristales, pero su presencia, aunque no constituye un defecto, ni un peligro para la salud del consumidor, hace que habitualmente se lleven a cabo procesos y técnicas de estabilización, para la eliminación de dichos cristales y la misma aceptación.

1.6 Determinación de la fracción ácida – Método de electroforesis capilar.

Generalmente los ácidos orgánicos han sido determinados por una serie de técnicas cromatográficas como cromatografía de gases, y cromatografía iónica. Estos métodos son precisos, pero aún existe una demanda de técnicas que ofrezcan una mejor eficiencia de separación. Por ello se han desarrollado métodos alternativos como electroforesis capilar, debido a su analítica adecuada, su bajo consumo de sustancias químicas, alta resolución y velocidad y su simplicidad [22].

La electroforesis capilar es una técnica de separación utilizada en distintas áreas (química, bioquímica...) para separar las diferentes moléculas presentes en una disolución. La separación se lleva dentro del capilar, donde se encuentra la disolución que contiene los analitos o moléculas a

separar y el tampón que es el encargado de conducir la corriente. La separación se lleva a cabo según la relación masa/carga de las distintas moléculas. Para que esto sea posible, se aplica una diferencia de potencial entre los dos extremos del capilar, para que las moléculas se muevan hacia un extremo u otro del capilar, lo que se denomina como movilidad electroforética y que se vayan separando entre sí (las moléculas catiónicas hacia el polo negativo y las aniónicas hacia el polo positivo).

Además, dentro del capilar existe también el fenómeno denominado flujo electroosmótico que es debido a la carga de la superficie interna del capilar. El flujo electroosmótico es el mismo dentro de todo el capilar y afecta de igual forma a todas las moléculas arrastrándolas hacia uno de los extremos. Así la separación se verá afectada por el flujo electroosmótico y por la movilidad electroforética de cada una de las moléculas.

La eficacia y la velocidad de la separación mejoran mediante la optimización de diferentes factores como son la temperatura, voltaje aplicado, medio de separación, composición y concentración de la muestra, el disolvente en el que se encuentra disuelta la muestra... Generalmente se obtienen tiempos de análisis bastante bajos en comparación con otras técnicas separativas como la cromatografía de gases o la de líquidos. Además, el consumo de muestra y reactivos es muchísimo menor por lo que se la puede considerar una técnica más limpia. [5]

El fundamento se debe a las separaciones de los solutos de una mezcla por migraciones diferenciales en un electrolito tamponado (tampón). La electroforesis tiene lugar en un capilar de sílice de diámetro interno de 50 μm y 60 cm de longitud. Los solutos a separar son impulsados simultáneamente por dos fuerzas que pueden actuar en el mismo sentido o en sentido contrario. Estas dos fuerzas se deben al campo eléctrico y al flujo electroosmótico, por lo que las especies iónicas del electrolito y de la muestra migran hacia el electrodo correspondiente, creando así un movimiento de los iones.

El campo eléctrico está representado por la tensión en voltios aplicada entre los electrodos. El ión se caracteriza por su movilidad: cuanto más pequeñas y cargadas estén las moléculas, mayor será su movilidad electroforética. La elección del pH del tampón y el uso de aditivos permiten controlar el sentido y la intensidad de este flujo electro-osmótico [18], [23], [24].

La instrumentación habitual de un equipo de electroforesis capilar está representada gráficamente en la Figura 1. El equipo cuenta con una fuente de alto voltaje (normalmente, de 0 a 30 kV), un capilar, dos viales para el tampón de separación que contienen, además, los extremos del capilar y los electrodos conectados a la fuente de alto voltaje. Los equipos cuentan con un sistema de termostatación para el mantenimiento de la temperatura del capilar es clave, logrando así

separaciones de alta eficacia y reproducibles. Los detectores más habituales están basados en técnicas espectroscópicas, siendo la detección ultravioleta (UV) la más utilizada. [25]

A continuación, se detalla la descripción del equipo:

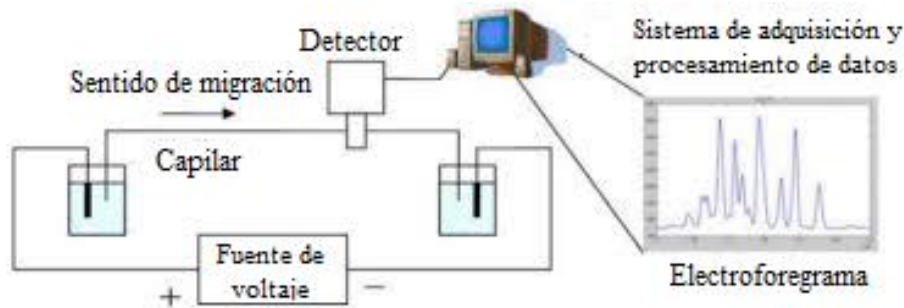


Figura 1. Esquema de un equipo de Electroforesis Capilar.

Inyector automático de las muestras: el volumen de muestra inyectada viene definido por las dimensiones del capilar, la viscosidad del electrolito, presión aplicada y el tiempo. Normalmente, la inyección de la muestra se realiza en el extremo del capilar más alejado del punto de detección. Para ello, se sustituye el vial que contiene el tampón de separación por otro vial con la muestra en disolución. En ese momento, y durante un tiempo establecido, se aplica una presión (inyección hidrodinámica) o un voltaje (inyección electrocinética) determinados. [25]

Fuente de alto voltaje (fuente de potencial): fuente de corriente continua de alta tensión conectada a dos electrodos inmersos en un electrolito. el voltaje de separación una vez inyectada la muestra suele aplicarse en el modo denominado polaridad normal, es decir, el ánodo en el vial de separación más alejado del detector y el cátodo en el vial de separación más cercano al detector

Columnas de electroforesis capilar: capilar de sílice no revestido de 50 μm de diámetro interno y de 60 cm de longitud entre la entrada del capilar y la célula de detección. El material que constituye el capilar ha de tener una serie de propiedades: ha de ser química y eléctricamente estable, transparente a la luz ultravioleta y flexible. En este caso el capilar no está revestido para evitar intercadencias con la luz ultravioleta.

Detector de UV: la detección se realiza directamente sobre el capilar, la cual significa que el mismo capilar actúa como celda de detección. El detector ultravioleta - visible (UV-VIS) es uno de los más empleados en electroforesis capilar. En la mayoría de casos, se trabaja con una longitud de onda no óptima para cada uno de los compuestos a determinar. La longitud de onda escogida es de 214 nm, que aun no siendo el valor óptimo para todos los analitos, representa un compromiso entre las longitudes de onda óptimas de todos los compuestos del estudio, siendo la que proporciona la mayor sensibilidad para los compuestos.

Sistema de adquisición de datos: equipo disponible Beckman Instruments, y Software de control 32Karat.

Recipientes del electrolito: los extremos del capilar están colocados en dos recipientes que contienen una disolución del electrolito [18], [23], [24].

La electroforesis capilar (CE) es una técnica de separación que se basa en la diferente movilidad electroforética de los analitos bajo la acción de un campo eléctrico. La separación se lleva a cabo en el interior de un tubo capilar de sílice con diámetro reducido. La CE mejora el poder de resolución de la electroforesis convencional, la cuantificación de los analitos y la mejora de la reproducibilidad, entre otras ventajas. Los análisis por CE son muy rápidos (en general, menores de 30 min) y requieren muy poco volumen de muestra. Los analitos que pueden analizarse con esta técnica son muy variados (desde iones hasta proteínas o células) [25].

1.7 Determinación del color.

- Índice de polifenoles totales

Como se ha mencionado anteriormente, el proceso de estabilización por frío puede provocar pérdida de la materia colorante, debida a los compuestos fenólicos. Es por esta razón por la que conviene controlar este parámetro tras el proceso de estabilización.

Los compuestos polifenólicos de la uva se encuentran en la piel, especialmente en las células epidérmicas y en las pepitas. El proceso de elaboración de los vinos comienza con la obtención del vino base procedente de uvas blancas o tintas, obteniendo así vinos blancos cuando la fermentación tiene lugar sin el contacto entre hollejo y mosto y vino tintos cuando hay un contacto con los hollejos, por lo que su color dependerá del tiempo y la intensidad de la maceración. Por esta razón, la cantidad de compuestos fenólicos que se encuentran en el vino tinto es mayor que la de los vinos blancos y rosados, ya que en el proceso de elaboración del vino tinto se incluye el proceso de maceración del mosto con la piel y partes sólidas de la uva, principal origen de los polifenoles.

Los polifenoles contribuyen en las características organolépticas del vino (color, astringencia, etc.). La cantidad y calidad de polifenoles en la uva depende principalmente de la variedad de la vid, del clima, del terreno y de las prácticas de cultivo.

El fundamento de esta técnica analítica se basa en la obtención del índice por la medida de la absorbancia del vino a 280nm (UV), porque el núcleo bencénico característico de los compuestos polifenólicos tiene su máximo de absorbancia a esta longitud de onda [26].

Los valores del IPT están comprendidos entre 6 y 120, indicando que a mayor valor, mayor será la riqueza fenólica, siendo la medida una estimación de la cantidad global de compuestos fenólicos presentes en el vino tinto [27]. El IPT se determina mediante la siguiente ecuación:

$$\text{IPT} = A_{280} \times \text{Factor Dilución.}$$

Los vinos blancos tienen un IPT entre 4 y 10, mientras que los vinos tintos están entre 35 y 60 los jóvenes y 50 y 100 los vinos de crianza y reserva.

- **Características cromáticas: intensidad colorante y tonalidad.**

Las características cromáticas de un vino se determinan mediante espectrofotometría UV-VIS, midiendo las absorbancias a tres longitudes de onda características: 420nm (componente amarilla), 520nm (componente roja) y 620nm (componente azul), permitiendo definir su intensidad colorante y tonalidad. La intensidad colorante, representa la totalidad del color, lo que es a su vez, la importancia del color. La tonalidad representa la proporción de color amarillo con relación al color rojo. Es el nivel de evolución del color hacia el naranja.

Las medidas colorimétricas están muy influenciadas por la limpidez de la muestra, su contenido en SO₂ libre y su acidez. por lo tanto, su interpretación debe tener en cuenta estos elementos. la muestra nunca debe diluirse, ya que la dilución modifica el equilibrio entre los componentes del vino [28].

2. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es el estudio de ácidos orgánicos en vino mediante electroforesis capilar y la estabilidad de los mismos, así como un estudio de las características enológicas, cromáticas y sensoriales de las distintas muestras de vino.

A partir de las muestras de vino blanco y tinto de la variedad Merseguera, Macabeo y Tempranillo, Merlot respectivamente, sin realizar ningún tipo de tratamiento previo, se llevan a cabo distintos procesos de estabilización en el vino, para analizar las siguientes determinaciones:

- Optimización del método y procedimiento de preparación de la muestra.
- Determinación de los distintos ácidos orgánicos por Electroforesis Capilar, analizando la influencia de distintas variables como la adición de diferentes aditivos y/o técnicas.
- Caracterización de estas muestras, evaluando el índice de estabilidad de las muestras óptimas.
- Estudiar características enológicas y cromáticas.

Los procesos de estabilización que se llevan a cabo son los siguientes:

- Aplicación de Zenith White® y Zenith Color®, a vino blanco y tinto respectivamente, a distintas dosis (5g/hL y 10g/hL).
- Aplicación de aditivos: goma arábiga y CMC para vino blanco, y únicamente goma arábiga en vino tinto.
- Aplicación de frío.
- Muestras testigo.

La posible influencia de estos procesos de estabilización sobre la fracción ácida de los vinos estudiados se estudió a partir de la composición de la fracción ácida determinada mediante electroforesis capilar. Esta fracción incluye ácidos procedentes principalmente de la uva (tartárico, málico y cítrico) y de los derivados de la fermentación (succínico, acético y láctico) así como el glucónico, fosfórico y sulfato.

Se pretende estudiar cómo afectan los estabilizantes añadidos a nuestros vinos, optimizando así el tratamiento de estabilización tartárica, minimizando así el coste del proceso y los efectos negativos sobre la calidad, pero manteniendo una adecuada estabilidad tartárica de los vinos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Materiales

- Instrumentación

Todos los análisis para la determinación de ácidos orgánicos se realizaron utilizando un sistema de electroforesis capilar equipado con un detector UV (Beckman Coulter, MDQ-32 Karat, Fullerton, California) en columna y una fuente de alimentación negativa. La separación se efectuó en un capilar de sílice no revestido de 50 μm de diámetro interno y de 60 cm de longitud entre la entrada del capilar y la célula de detección. Para cada tratamiento, obtenemos una muestra óptima, siendo las muestras que han tenido una mejor separación frente a la electroforesis capilar, es decir, una mejor lectura de los picos de los ácidos en los electroforegramas. Estas muestras óptimas serán usadas para el resto de análisis.

La estabilidad de las muestras se determinó mediante el equipo Tartarcheck (Exacta Wine&Beverage, GAB Sistemática Analítica S.L., Moja-Olerdola, Barcelona, España) midiendo la estabilidad tartárica en vinos, basándose en el principio de aceleración de la precipitación de bitartrato potásico (THK) que se agrega en exceso en forma de cristales finos, por lo que mide la diferencia entre la conductibilidad de un vino y aquella del mismo vino en presencia de un exceso de THK a 0°C [6]. Se realiza una medida de cada muestra óptimas para cada tratamiento.



Figura 2. Equipo Tartarcheck: medidor de estabilidad tartárica en vinos.

Para la determinación de polifenoles totales, intensidad colorante y tonalidad se usa espectrofotómetro (UV-Visible) (Jenway™ 6715 UV/VIS Spectrophotometer). Se analiza una sola muestra de cada tratamiento de vino, aquella que hemos determinado como óptima, pero esta vez se llevan a cabo tres repeticiones de cada una, y se expresa la media de ellas. Finalmente, para el análisis general de las muestras se usa espectrómetro FTIR Nicolet™ iS5, Thermo Scientific™, analizándose dos muestras (óptima y aleatoria), pero solo se realiza una sola repetición del análisis.

- Reactivos

Todos los productos químicos, obtenidos de diferentes proveedores, eran de calidad analítica.

Las muestras de los ácidos orgánicos se prepararon diariamente a partir de una disolución madre de 1 g/L y se diluyeron a la concentración requerida antes de su uso.

Para las disoluciones madre de calibrado: ácido D, L-málico: $C_4H_6O_5$ (pureza 99,5%), ácido cítrico monohidratado: $C_6H_8O_7$ (pureza 99,5%), proporcionado por Merck KGaA, (Darmstadt, Alemania). Ácido L-tartárico: $(CHOH)_2(COOH)_2$ (pureza 99,5%), proporcionado por Montplet & Esteban SA (Barcelona, España). Ácido succínico: $C_2H_4(COOH)_2$ (purísimo) y sulfato de sodio: Na_2SO_4 (extrapuro 98,5-101%) proporcionados por Scharlab (Barcelona, España). Ácido D, L láctico: $C_3H_6O_3$ (pureza 98%), dihidrógenofosfato de sodio dihidrato: $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (riqueza 99-101%), proporcionado por Panreac (Barcelona, España). Gluconato de sodio: $C_6H_{11}NaO_7$ (pureza 99%), sulfato de sodio: Na_2SO_4 (extrapuro 98,5-101%), proporcionado por Scharlab (Barcelona, España).

Para la disolución madre de patrón interno: clorato de sodio: $NaClO_3$ (pureza >98%), proporcionado por Emplura® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Para tampón electroforético: ácido dipicolínico: $C_2H_5NO_4$ (pureza 99%), proporcionado por Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Bromuro de cetil-trimetil-amonio: $C_{19}H_{40}BrN$ (extrapureza <99%), proporcionado por Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Acetonitrilo para CLAR: CH_3CN (calidad HPLC 99,9%), hidróxido de sodio: $NaOH$ (pureza 95-100,5%), proporcionados por Scharlab (Barcelona, España).

Para la determinación de estabilidad: bitartrato potásico en polvo, proporcionado por Scharlab (Barcelona, España).

Para los tratamientos de estabilización: CMC (Cellogum LV 20), goma arábica (Citrogum), Zenith White®, Zenith Color®, proporcionados por Enartis, (La Rioja, España).

Para la realización de disoluciones, así como la determinación de distintos análisis, se utiliza agua pura desionizada, ultrafiltrada.

3.2. Métodos

- Muestras de vino y preparación

Es fundamental conocer qué variables realmente influyen sobre el sistema analizado y cuantificar su influencia. Para conseguir esto es necesario variar las condiciones experimentales y observar los efectos producidos en la variable respuesta.

Los tratamientos de estabilización se realizaron como ensayos independientes en cada una de las botellas, siendo así muestras independientes etiquetadas con un código diferente.

Las botellas son proporcionadas por la Cooperativa Villar del Arzobispo.

Inicialmente se obtienen un total de 29 botellas para vino blanco y otras 29 botellas para el vino tinto. De éstas, 6 botellas se asignan para cada tratamiento de cada tipo de vino a excepción del frío que solo tiene 5 botellas.

A las 6 botellas de los tratamientos “Aditivo”, Zenith White®, 5g/hL y Zenith White® 10g/hL en vino blanco y a los grupos de 6 botella de “Aditivo”, Zenith Color® 5g/hL y Zenith Color® 10g/hL en vino tinto, se les agregó el preparado comercial en la dosis indicada (Tabla 2), agitando inmediatamente. A continuación, se dejaron en reposo, mínimo una hora para su actuación y posteriormente se decantó el vino a otras botellas limpias y fueron etiquetadas. El tratamiento por frío tanto para las 5 botellas de vino blanco como de tinto se realizó almacenando todas las botellas a 4º C durante una semana. Finalizado el tratamiento se decantó el vino a botellas limpias. Las 6 botellas de testigo blanco y las 6 de tintos fueron directamente almacenadas a 20º C en oscuridad hasta el momento del análisis.

Analizaremos la influencia de los procesos de estabilización o adición de productos estabilizantes distintos que se añaden a las muestras de vino y cómo influye en la presencia de ácidos orgánicos de nuestros vinos. Así tendremos:

Tabla 2. Muestras vino

VINO BLANCO		VINO TINTO	
TESTIGO	6 muestras	TESTIGO	6 muestras
ADITIVO: (goma arábica 2g/L + CMC 100mg/L)	6 muestras	ADITIVO: (goma arábica, 2g/L)	6 muestras
ZENITH WHITE® (5g/hL)	6 muestras	ZENITH COLOR® (5g/hL)	6 muestras
ZENITH WHITE® (10g/hL)	6 muestras	ZENITH COLOR® (10g/hL)	6 muestras
FRÍO	5 muestras	FRÍO	5 muestras

Los vinos se elaboraron a partir de variedades tradicionales de uva de estas regiones españolas, siguiendo las prácticas habituales de vinificación utilizadas en estas zonas vinícolas. Las muestras se recogieron en botellas de vidrio de 750mL.

- **Electroforesis capilar**

Con el fin de desarrollar un método de Electroforesis Capilar simple y preciso para la determinación cuantitativa de ácidos orgánicos en el vino, se llevó a cabo la optimización de las condiciones de separación y se puso a punto el método.

La linealidad, precisión, exactitud, límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ) se investigaron como parámetros de validación del método. Los picos de los compuestos se identificaron por sus tiempos de repetición y se compararon con los patrones. La cuantificación se realizó con curvas de calibración externas del tampón. El límite de detección se determinó como $LD = 3 \times \text{Área media}$ y el límite de cuantificación como $LQ = 10 \times \text{Área media}$ [4].

Acondicionamiento de Columna Capilar

Con el fin de obtener una línea de base estable, el capilar se acondicionó diariamente según el siguiente ciclo: circulación de agua miliQ en sentido contrario, durante 10 minutos a una presión de 40psi, seguido de tampón en sentido inverso durante 15 minutos a una presión de 30psi, seguido de un voltaje de 20Kv durante 5 minutos en sentido directo con tampón.

Condiciones de separación

Las condiciones de funcionamiento se optimizaron a una temperatura de 25°C aproximadamente y la tensión aplicada fue de 20kV, y la detección se realizó mediante rayos UV a 254nm.

Determinación de ácidos orgánicos por EC

Para la determinación de los ácidos orgánicos mediante electroforesis capilar fue necesario preparar previamente la disolución patrón. La calibración es el proceso por el que se establecen relaciones entre los valores proporcionados por los instrumentos y los que se conocen, o que se establecen mediante un análisis o patrón de referencia [2]. En nuestro estudio se realizó una calibración externa multinivel por el método del patrón interno a 7 niveles de concentración (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 mg/L).

A partir de una disolución madre de calibrado, que contiene 10g/L de cada ácido a determinar, se preparan diluciones a 7 niveles para poder obtener la recta de calibrado de cada ácido.

Las disoluciones de calibrado a inyectar se preparan añadiendo diferentes volúmenes de la disolución madre de calibrado y 0,1mL de la disolución de PI completándolo hasta los 5mL con agua pura.

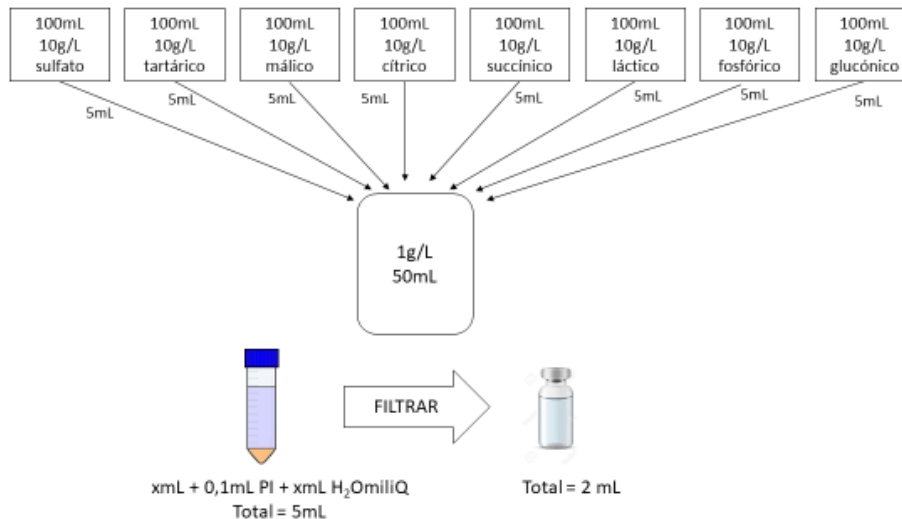


Figura 3. Procedimiento de preparación de muestras para la realización de disolución de calibrado.

Para la preparación de las muestras para el ensayo, añadimos 0,2mL de vino, 0,1mL de patrón interno y 4,7mL de agua pura y se filtra a través de una membrana de 0,45µm para obtener 2mL de filtrado en el vial electroforético.

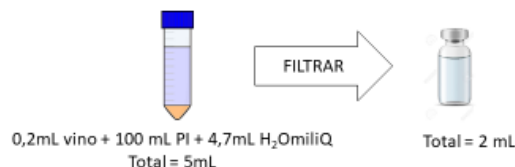


Figura 4. Procedimiento de preparación de muestras de vino.

Las muestras obtenidas se inyectaron directamente en el sistema de electroforesis capilar mediante inyector automático.

- **Medida de la estabilidad – Test de Boulton**

El equipo registra el valor inicial de conductividad antes de agregar el bitartrato potásico y, aunque mide en continuo desde el inicio de la adición del tartrato hasta 10 minutos después, como valor final se toma la variación desde el tiempo 0 hasta los 3 minutos, para comprobar si la muestra continúa estable en el tiempo.

La muestra del vino se coloca en un baño termostático a 0 °C. y se provoca una precipitación rápida de los cristales de bitartrato potásico añadiendo 1g de bitartrato potásico en polvo en un vaso de 250mL conteniendo 100mL del vino muestra

La cinética de precipitación se realiza midiendo la conductividad eléctrica de la muestra, que depende de los iones de disolución que aún no han precipitado, en una cámara termostatazada. La diferencia entre la conductividad antes de la adición de bitartrato potásico y la conductividad final, proporciona una medida de la inestabilidad parcial en bitartrato potásico. Cuando la sobresaturación se reduce a cero, ya no hay más precipitación y el valor de la conductividad permanece constante. La muestra tiene en estos momentos las características de un vino estable, y esta conductividad es la que debe tenerse en cuenta. [8]

- **Índice de polifenoles totales**

El procedimiento consiste en diluir la muestra de vino con agua destilada en un factor 1/20 (v/v) para el vino blanco y 1/100 (v/v) para el vino tinto en celdas de cuarzo de 1cm de camino óptico, utilizando agua destilada como referencia, es decir, como blanco. En las condiciones de dilución, los ácidos orgánicos, el alcohol y el sulfuroso tienen una absorción muy débil. Finalmente, se obtiene el índice por la medida de la absorbancia del vino a 280nm (UV) y aplicando el factor de dilución [29].

- **Características cromáticas**

La intensidad colorante (IC), es un parámetro determinado mediante espectrofotometría UV-VIS y se determina a través de la suma de las absorbancias a 420, 520 y 620nm. Medimos la absorbancia del vino directamente, sin diluir, en cubeta de cuarzo o de plástico de 1cm para los vinos blancos:

$$(IC = A_{420} + A_{520} + A_{620})$$

La tonalidad del vino tinto, se explica como el cociente entre la absorbancia a 420 y 520nm.

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

Para muchos vinos tintos, la absorbancia en alguna de las longitudes de onda es un valor tan alto, que puede saturar el equipo, por lo que resulta una lectura incorrecta. Para evitar que esto ocurra, se lleva a cabo la medida en vino utilizando una celda de camino óptico menor (0,2cm) y se corrige el valor resultante, para referirnos al vino sin diluir medido en una cubeta de 1cm de camino óptico. [29]

$$IC = (A_{420} + A_{520} + A_{620}) / \text{Espesor cubeta (0,2cm)}$$

3.3. Análisis estadístico

Los datos experimentales se analizaron mediante parámetros estadísticos simples para expresar los resultados a través de los valores medios y la correspondiente desviación estándar en aquellos análisis en los que se estudiaron 2 muestras de cada tipo. También se efectuaron análisis de varianza (ANOVA), con los resultados obtenidos de la fracción ácida, para determinar si el tipo de tratamiento de estabilización afectó significativamente a alguno de los ácidos estudiados, ya que se disponía de 5 ó 6 muestras independientes por tratamiento. El análisis de los datos se realizó utilizando STATGRAPHICS Centurion XVII-X64.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se muestran los resultados de los distintos tratamientos que se han realizado, comparando así el tratamiento Zenith a dos dosis distintas (White o Color) para vino blanco y tinto respectivamente), frente al tratamiento clásico por frío, teniendo una muestra testigo con los aditivos del Zenith para cada tipo de vino y un testigo sin ningún tipo de tratamiento.

Se realiza un estudio de la composición de la fracción ácida, mediante electroforesis capilar, en las muestras de vino sometidas a los diferentes tratamientos estabilizantes. Además, se estudió la estabilidad de las muestras de vino con distintas adiciones y estabilizantes. Una vez estudiada su estabilidad, se analiza el índice de polifenoles totales, intensidad colorante, tonalidad y características generales de las mismas muestras.

Si bien los análisis de la fracción ácida por electroforesis capilar fueron los primeros en realizarse, para facilitar la discusión de resultados, se explican al final de este capítulo. No obstante, aquellas muestras de cada tratamiento que presentaron la mejor separación electroforética fueron marcadas como “óptimas” y seleccionadas para ser sometidas al resto de análisis, a excepción del análisis general, que también se analiza otra muestra aleatoria.

4.1. Estabilidad

Los análisis de estabilidad de las muestras fueron estudiados a utilizando el equipo Tartarchek, tal y como se describe en el apartado 1.3 sobre procesos de estabilización y en el apartado 3.2 de Material y Métodos.

Con los datos de estabilidad mostrados en la Tabla 1 del apartado procesos de estabilización (1.3), podemos determinar la estabilidad de nuestras muestras, que se indican en las tablas siguientes, mostrándose la diferencia entre la conductibilidad de una muestra vino y del mismo vino en presencia de un exceso de THK a 0°C, con la variación en el tiempo.

Solamente se hizo una medida por cada muestra. Ninguno de estos vinos lleva filtración, por lo que ésta no influye en la estabilidad de nuestras muestras.

En la Tabla 3 se muestra la comparativa de las muestras de vino blanco de los distintos tratamientos con Zenith White® frente al tratamiento por frío, además de tener testigo de los aditivos del Zenith White® y un testigo sin ningún tratamiento.

Tabla 3. Estabilidad en muestras de vino blanco.

VINO BLANCO	X inicial (μS)	X final (μS)	ΔX inicial (μS)	ΔX 3 min (μS)	ESTABILIDAD
Testigo	864	735	129	102	Inestable
Aditivo (goma arábica + CMC)	874	816	58	39	Estable
Zenith White® 5g/hL	853	770	83	52	En riesgo
Zenith White® 10g/hL	875	850	25	23	Estable
Frío	820	722	98	78	Inestable

Al estudiar la variación de estabilidad a los 3 minutos, observamos que la muestra de vino blanco con Zenith White a dosis 10g/hL es la más estable, con una diferencia de conductibilidad de 23 μS, seguida de la muestra con aditivo (goma arábica y CMC). La muestra de Zenith White a dosis 5g/hL, está en el límite de estabilidad en riesgo con una conductividad de 52 μS,, mientras que las muestras sometidas a frío y la testigo son inestables, teniendo esta ultima una inestabilidad mayor.

Se observa que el Zenith White® a dosis 10g/hL actúa positivamente en la estabilidad del vino, haciendo que sea muy estable a lo largo del tiempo. A su vez los aditivos de dicho producto (goma arábica y CMC) también ayudan a estabilizar la muestra. La dosis de Zenith White a 5g/hL no resulta suficiente a pesar de llevar los aditivos, puesto que, al adicionar menos producto, también se adicionan estos en menor proporción. Además, en estos ensayos, el tratamiento en frío aplicado no es suficiente para estabilizar completamente la muestra, mientras que dejar a la muestra sin ningún tipo de tratamiento provoca una inestabilidad elevada.

A continuación, se muestra en la Figura 5, los distintos gráficos de los análisis de estabilidad de muestras de vino blanco.

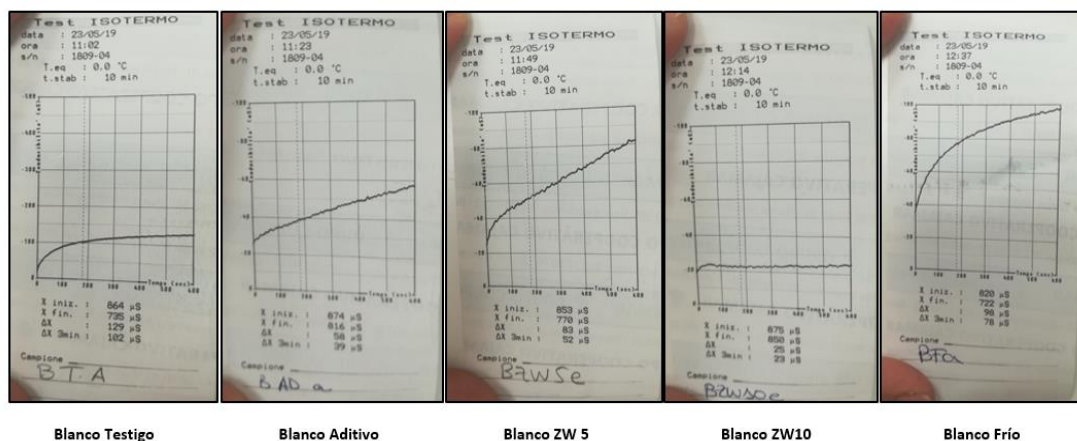


Figura 5. Gráficos de estabilidad de muestras de vino blanco.

En la Tabla 4 se recogen los resultados correspondientes a los distintos tratamientos de estabilización realizados sobre Zenith Color® a distintas dosis, muestra sometida a frío, muestra testigo, y muestra con el aditivo del producto Zenith Color® (goma arábica).

Tabla 4. Estabilidad en muestras de vino tinto

VINO TINTO	X inicial (μS)	X final (μS)	ΔX inicial (μS)	ΔX 3 min (μS)	ESTABILIDAD
Testigo	988	949	39	31	Elevada
Aditivo (goma arábica)	997	975	22	20	Elevada
Zenith Color® 5g/hL	995	975	20	19	Elevada
Zenith Color® 10g/hL	986	966	20	19	Elevada
Frío	983	945	38	32	Elevada

Con respecto a la variación de estabilidad a los 3 minutos, y teniendo en cuenta los valores de estabilidad generados por el equipo, observamos que todas las muestras son estables, observándose una mayor estabilidad, con una conductividad igual o menor de 20 μS en las muestras con Zenith Color® a ambas dosis, frente a la muestra testigo y la muestra sometida a frío que, aunque también clasificados como de estabilidad elevada, tienen un valor menor. Incluso la adición en solitario de goma arábica produce muy buenos resultados.

Observamos que el Zenith Color® a ambas dosis interfiere positivamente en la estabilidad del vino, haciendo que sea muy estable a lo largo del tiempo, así como la muestra con los aditivos del producto. En este caso el tratamiento por frío no afecta negativamente, sino que, la muestra continúa siendo estable, con valores similares al vino sin tratamiento.

Teniendo en cuenta que todas las muestras de vino tinto son estables, frente a las de vino blanco que hay más variedad entre la estabilidad e inestabilidad, podemos intuir que los polifenoles del vino tinto pueden interceder en la estabilidad del vino, mejorando así ésta misma.

En la Figura 6, se muestran los distintos gráficos del análisis de estabilidad para las muestras de vino tinto.

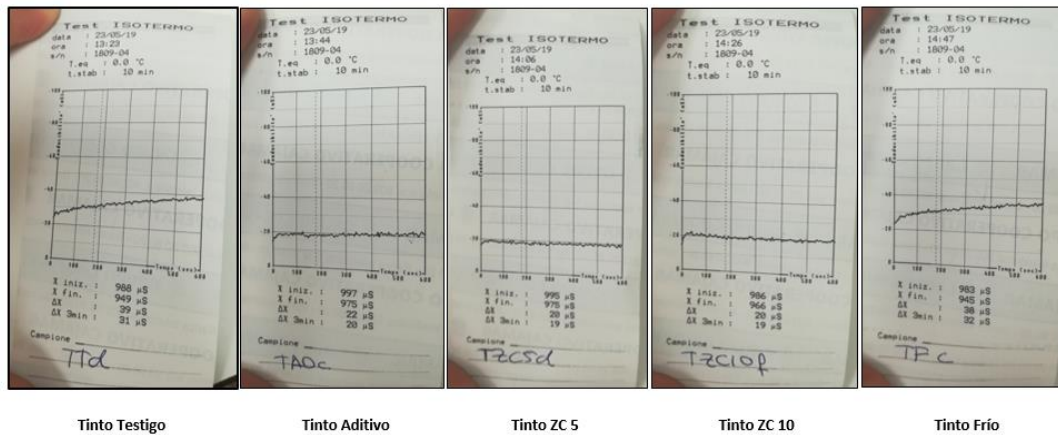


Figura 6. Gráficos de estabilidad de muestras de vino tinto.

Para ambos tipos de vino, se observa que el tratamiento con Zenith White® o Zenith Color®, respectivamente, como estabilizante, son muy adecuados. En el caso de vinos blancos la dosis ha de ser de 10g/hl y en el vino tinto estudiado fue suficiente con 5g/hl, aunque sería conveniente continuar el estudio con vinos tintos que fueran inestables de partida, pero a la vista de los resultados obtenidos vemos que influyen de manera positiva frente a la estabilidad.

El tratamiento por frío no es suficiente en el vino blanco, pero si en el tinto debido posiblemente a los polifenoles presentes en el vino estudiado que actúan en beneficio de una mejor estabilidad. Por ello se ha estudiado el comportamiento de los polifenoles frente a cada tratamiento, y se muestran a continuación.

4.2 Índice de Polifenoles Totales

A continuación, en las Tablas 5 y 6 se muestran los resultados del índice de polifenoles totales, tanto para vino blanco como para vino tinto, de los cuales se hicieron tres repeticiones por cada muestra óptima y se expresa la media de las repeticiones. Se muestran los datos de la absorbancia a 280nm para las muestras, medidas con el espectrofotómetro, y simplemente se multiplica por el factor de dilución, para obtener el IPT. También observamos gráficamente este índice de polifenoles totales en las figuras 5 y 6. Los valores del IPT deben estar comprendidos entre 6 y 120, siendo entre 4 y 10 para vino blanco, y para vino tinto, entre 35 – 50 para vinos jóvenes y 50 – 100 para vinos de crianza y reserva.

Tabla 5. Índice polifenoles totales en muestras de vino blanco. .

VINO BLANCO	ABSORBANCIA (280nm)	FACTOR DILUCIÓN	IPT
TESTIGO	0,517 ± 0,001	1/20	10,33 ± 0,01
ADITIVO	0,519 ± 0,002	1/20	10,38 ± 0,04
ZENITH WHITE® 5g/hL	0,516 ± 0,000	1/20	10,32 ± 0,00
ZENITH WHITE® 10g/hL	0,523 ± 0,002	1/20	10,46 ± 0,04
FRÍO	0,525 ± 0,001	1/20	10,51 ± 0,02

Con esto observamos que los vinos blancos tienen un valor de IPT alrededor de 10, por lo que se encuentra dentro del rango de valores esperado para un vino blanco, observando un aumento de los valores de IPT en los tratamientos frente a la muestra testigo, a excepción del Zenith White® a dosis más bajas, que es similar al valor de la muestra testigo.

Tabla 6. Índice polifenoles totales en muestras de vino tinto.

VINO TINTO	ABSORBANCIA (280nm)	FACTOR DILUCIÓN	IPT
TESTIGO	0,508 ± 0,002	1/100	50,83 ± 0,15
ADITIVO	0,509 ± 0,001	1/100	50,87 ± 0,05
ZENITH COLOR® 5g/hL	0,517 ± 0,002	1/100	51,70 ± 0,20
ZENITH COLOR® 10g/hL	0,522 ± 0,003	1/100	52,23 ± 0,32
FRÍO	0,505 ± 0,001	1/100	50,47 ± 0,11

En la Tabla 6, se reflejan los valores el IPT de muestras de vino tinto, siendo también similares entre sí. Podemos observar que los vinos con Zenith Color® a distintas dosis, son los que presentan mayor valor de IPT, mientras que el vino sometido a frío, tiene el valor más bajo, aun siendo similares todos entre sí. Los resultados obtenidos son propios de vinos tintos jóvenes, lo cual indica que tienen pocas posibilidades de vida en la barrica y que, por lo tanto, no pueden ser envejecidos por su riqueza fenólica media. [27]

Es evidente que los vinos tintos tienen que tener unos valores de IPT superiores a los del vino blanco, puesto que tienen un contenido en polifenoles mayores, debido al contacto de la piel de los hollejos con el mosto.

Podemos determinar que, en ambos vinos, tanto el Zenith White® como el Zenith Color® en la dosis más alta (10g/hL), ayuda a que los valores de IPT sean ligeramente más elevados.

La adición de los aditivos correspondientes al producto Zenith, goma arábica y CMC para vino blanco y únicamente goma arábica para vino tinto, se ha demostrado que no afecta a los valores de IPT, manteniéndose en valores intermedios, al igual que la muestra testigo.

4.3 Intensidad colorante y tonalidad

A continuación, se muestran las características cromáticas de las distintas muestras analizadas, tanto de vino blanco como de vino tinto. Se muestra directamente la media de las medidas previas, que fueron 3 repeticiones para cada absorbancia.

Las muestras de vino blanco analizadas presentan resultados similares en cuanto a la intensidad colorante (IC), la tonalidad (T) y la composición del color en todas las muestras de los distintos tratamientos, pudiéndose observar los resultados en la Tabla 7.

Tabla 7. Características cromáticas en muestras de vino blanco.

VINO BLANCO	IC	T	COMPOSICIÓN DEL COLOR		
			A420nm	A520nm	A620nm
TESTIGO	0,14 ± 0,00	5,06 ± 0,18	0,113 ± 0,001	0,022 ± 0,001	0,005 ± 0,000
ADITIVO	0,14 ± 0,00	4,93 ± 0,39	0,116 ± 0,002	0,024 ± 0,002	0,005 ± 0,001
ZENITH WHITE® 5g/hL	0,14 ± 0,00	5,06 ± 0,07	0,115 ± 0,002	0,023 ± 0,001	0,005 ± 0,001
ZENITH WHITE® 10g/hL	0,15 ± 0,00	4,61 ± 0,09	0,117 ± 0,001	0,025 ± 0,001	0,007 ± 0,001
FRÍO	0,14 ± 0,00	5,20 ± 0,13	0,116 ± 0,000	0,022 ± 0,001	0,005 ± 0,001

En cuanto a los vinos tintos, en la Tabla 8, observamos los distintos valores y encontramos similitudes en cuanto a la IC, así como en la tonalidad y en la composición de color, al igual que en las muestras de vino blanco, todas las muestras tienen una similitud entre sí.

Tabla 8. Características cromáticas en muestras de vino tinto.

VINO TINTO	IC	T	COMPOSICIÓN DEL COLOR		
			A420nm	A520nm	A620nm
TESTIGO	7,65 ± 0,00	0,68 ± 0,00	0,551 ± 0,001	0,810 ± 0,001	0,169 ± 0,001
ADITIVO	8,06 ± 0,00	0,70 ± 0,02	0,581 ± 0,001	0,834 ± 0,031	0,178 ± 0,001
ZENITH COLOR® 5g/hL	7,56 ± 0,00	0,68 ± 0,00	0,544 ± 0,001	0,800 ± 0,001	0,167 ± 0,001
ZENITH COLOR® 10g/hL	7,95 ± 0,00	0,68 ± 0,00	0,573 ± 0,001	0,840 ± 0,001	0,177 ± 0,001
FRÍO	7,78 ± 0,00	0,68 ± 0,00	0,560 ± 0,001	0,825 ± 0,001	0,170 ± 0,000

Para los resultados de las muestras de vino tinto, tenemos que tener en cuenta que la intensidad colorante, está determinada por el camino óptico de la celda de la cubeta, en este caso 0,2cm.

Aunque al hacer referencia a la IC se puede notar que la muestra de vino con aditivo, presenta un mayor valor en comparación con el resto, siendo la muestra con Zenith Color® a dosis de 5g/hL la que tienen un valor más bajo. Esto probablemente sea debido a la variabilidad propia entre muestras independientes, no pudiendo concluir que sean debidas a los diferentes tratamientos.

Evidentemente, la intensidad colorante en vinos tintos será mucho mayor que en vinos blancos, debido a la maceración de los hollejos con el mosto, como hemos explicado en el índice de polifenoles totales. Los antocianos que se encuentran en las pieles de las uvas, se combinan con los taninos, responsables de la astringencia, y al combinarse aportan una estabilidad del color en los vinos.

La tonalidad en vinos tintos tiene que estar dentro del rango de calidad entre 0,3 – 1,8 teniendo los vinos jóvenes un valor de 0,3 a 0,7, aumentando así durante el envejecimiento alcanzado un límite de 1,2 – 1,8 [27]. Observamos que todas nuestras muestras corresponden a vinos jóvenes, encontrándose en el límite máximo de estos valores, como bien nos indicaba los valores de índice de polifenoles totales.

Con estos resultados, podemos observar que no hay alteraciones en el color, tanto en vinos blancos como en tintos, puesto que los valores en los vinos tratados no presentan modificaciones frente a la muestra testigo.

4.4 Características generales.

A continuación, en las Tablas 9 y 10 se muestran las características generales de las muestras óptimas (m.o), y una segunda muestra aleatoria (m.a), frente a una muestra control tanto de vino blanco como tinto. Solo se hace una sola medida de cada muestra, es decir, no hay repeticiones.

Tabla 9. Características generales en muestras de vino blanco.

VINO BLANCO		ALCOHOL %	AV g/L	pH	AT g/L	G+F g/L	DENSIDAD g/L
CONTROL		13,25	0,56	3,74	4,67	7,98	0,9979
TESTIGO	(m.o)	12,04	0,39	3,45	4,66	0,96	0,9941
	(m.a)	12,10	0,39	3,45	4,46	0,90	0,9942
ADITIVO	(m.o)	12,06	0,39	3,46	4,70	1,03	0,9943
	(m.a)	12,06	0,39	3,46	4,55	0,89	0,9944
ZENITH WHITE® 5g/hL	(m.o)	12,07	0,41	3,46	4,54	0,83	0,9943
	(m.a)	12,08	0,39	3,46	4,68	0,86	0,9941
ZENITH WHITE® 10g/hL	(m.o)	12,08	0,39	3,45	4,55	0,88	0,9942
	(m.a)	12,07	0,39	3,46	4,43	0,80	0,9943
FRÍO	(m.o)	12,07	0,40	3,44	4,51	0,87	0,9940
	(m.a)	12,08	0,38	3,44	4,44	0,72	0,9941

Tabla 10. Características generales en muestras de vino tinto.

VINO TINTO		ALCOHOL %	AV g/L	pH	AT g/L	G+F g/L	DENSIDAD g/L
CONTROL		13,27	0,57	3,73	4,66	7,84	0,9977
TESTIGO	(m.o)	13,26	0,53	3,67	5,05	1,06	0,9947
	(m.a)	13,24	0,53	3,68	4,82	1,07	0,9951
ADITIVO	(m.o)	13,25	0,53	3,67	5,08	1,13	0,9949
	(m.a)	13,19	0,52	3,67	4,83	1,18	0,9952
ZENITH COLOR® 5g/hL	(m.o)	13,22	0,54	3,68	5,01	1,13	0,9949
	(m.a)	13,13	0,53	3,68	4,99	1,28	0,9950
ZENITH COLOR® 10g/hL	(m.o)	13,24	0,53	3,69	4,93	1,24	0,9950
	(m.a)	13,10	0,53	3,68	5,07	1,20	0,9949
FRÍO	(m.o)	13,18	0,53	3,68	5,01	1,33	0,9949
	(m.a)	13,15	0,52	3,68	5,06	1,22	0,9950

En cuanto a las características generales, como el grado alcohólico, acidez volátil y total, pH, densidad..., podemos ver que los tratamientos realizados no influyen en los valores, puesto que todos los datos son similares entre sí, por lo que observamos que el tratamiento con Zenith a ambas

dosis, tanto en vinos blancos como en vinos tintos no afecta a estas características generales, así como tampoco afecta por otra parte el tratamiento con frío, ni la adición de los aditivos.

4.5 Determinación de ácidos orgánicos

Finalmente, se muestran los resultados de la fracción acida mediante el análisis por electroforesis capilar, haciendo referencia a la concentración obtenida de las distintas áreas que se han conseguido en los electroforegramas adquiridos en el análisis. En el Anexo se puede consultar los electroforegramas para las distintas muestras tanto de vino blanco, como de vino tinto.

Los datos de optimización del método, se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11. Parámetros de calidad del método: ecuación de la recta de calibrado (sensibilidad), coeficiente de regresión, LD, LQ.

ÁCIDOS	ECUACIÓN DE LA RECTA	R ²	LD (mg/L)	LQ (mg/L)
SULFATO	y = 15,429x + 136,84	0,9849	-5,40	2,69
TARTÁRICO	y = 18,172x + 93,146	0,9883	-2,18	4,69
MÁLICO	y = 25,35x + 65,796	0,9965	-0,49	4,44
CÍTRICO	y = 22,622x - 34,173	0,9972	3,88	9,39
SUCCÍNICO	y = 22,217x + 129,07	0,9808	-3,40	2,22
LÁCTICO	y = 17,798x + 57,408	0,9877	-0,22	6,80
FOSFÓRICO	y = 14,331x + 17,926	0,9957	2,48	11,19
GLUCÓNICO	y = 10,128x + 49,56	0,9762	0,39	12,71

El método optimizado y validado, según el método OIV-MA-AS313-19 (Método tipo II para los ácidos orgánicos y Método Tipo III para los sulfatos) [30], se aplicó al análisis de ácidos orgánicos en vinos blancos y tintos.

A partir de los electroforegramas generados por Electroforesis Capilar, obtenemos las áreas de los picos relevantes en patrones y muestras, por lo que procederemos a realizar los cálculos para obtener la concentración de los analitos en las muestras.

Teniendo en cuenta que el área del patrón interno debería ser constante en patrones y muestras, el área del analito en la muestra debe corregirse, como en la siguiente ecuación:

$$\text{Área de ácido en la muestra corregida} = \text{Área de ácido en muestra} * \frac{\text{Área media PI}}{\text{Área PI muestra}}$$

Se registran las áreas de los picos del patrón interno, y de los picos de los solutos para cada muestra. Las áreas de los solutos a cuantificar vuelven a calcularse teniendo en cuenta de nuevo las variaciones de área de los picos del patrón interno para obtener las áreas denominadas corregidas. A continuación, se muestra la ecuación para obtener la concentración de ácido en cada muestra.

$$\text{Concentración de ácido en cada muestra} = \frac{\text{Área ácido muestra corregida} - b}{a} * 25$$

Tenemos que tener en cuenta que patrones y muestras fueron diluidos 1/25, por lo que hay que multiplicar la concentración por 25.

A continuación, se muestran las concentraciones tanto en vino blanco como en tinto, la media de las mismas.

Primero se muestra un ejemplo de cómo se ha obtenido la concentración de, en este caso, ácido tartárico para una muestra de vino blanco testigo "a"

$$- \text{Área corregida de ácido tartárico} = 1416 * \frac{525}{459} = 1620$$

Después, con la ecuación de la recta de calibrado para el ácido tartárico: $y = 18,172x + 93,146$, sustituimos el valor de la "y" por el área corregida de ácido tartárico, y obtenemos "x", que será la concentración en mg/L de ácido tartárico en la muestra de vino.

$$- y = 18,172x + 93,146 \rightarrow x = \frac{1620 - 93,146}{18,172} \rightarrow x = 84,02$$

Finalmente, se tiene en cuenta el factor de dilución 1/25, por lo que

$$- 84,02 * 25 = \mathbf{2100\text{mg/L}}$$
 de ácido tartárico hay en la muestra de vino blanco testigo "a".

El mismo procedimiento haremos con el resto de muestras. En las Tablas 12 y 13, se resumen las concentraciones medias de ácidos orgánicos de cada tratamiento en las distintas muestras de vinos blancos y tintos determinados por EC.

Tabla 12. Concentración media de ácidos en cada muestra de vino blanco.

CONCENTRACIÓN mg/L EN EL VINO MEDIA DE TODOS LAS MUESTRAS	BLANCO TESTIGO (n=6)	BLANCO ADITIVO (n=6)	BLANCO ZW 5 (n=6)	BLANCO ZW 10 (n=6)	BLANCO FRÍO (n=5)
SULFATO	420 ± 145 ^{bc}	353 ± 36 ^{ab}	215 ± 223 ^a	300 ± 87 ^a	495 ± 39 ^c
TARTÁRICO	2136 ± 165	2039 ± 114	2125 ± 127	2011 ± 288	2272 ± 149
MÁLICO	582 ± 120	561 ± 101	618 ± 76	547 ± 81	699 ± 60
CÍTRICO	311 ± 57	286 ± 37	318 ± 46	280 ± 45	353 ± 49
SUCCÍNICO	656 ± 83	685 ± 178	668 ± 86	659 ± 103	792 ± 77
LÁCTICO	182 ± 85	204 ± 56	209 ± 59	165 ± 36	239 ± 65
FOSFÓRICO	518 ± 154	446 ± 135	548 ± 73	513 ± 107	639 ± 66
GLUCÓNICO	1627 ± 257	1477 ± 268	1600 ± 163	1463 ± 202	1842 ± 224

Letras superíndices: presentaron medias significativamente distintas para los diferentes tratamientos

n = nº de muestras analizadas para cada tratamiento

La Tabla 12 nos muestra la concentración media de ácidos de en cada muestra de vino blanco, determinando que el análisis de la varianza indica que solamente el Sulfato es, con un valor-P <0,05, el único ácido con una diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 5% de significación, entre los distintos tratamientos realizados

El tratamiento con Zenith White® presentó concentraciones más bajas de sulfato que el testigo, y menos que el tratamiento convencional por frío, que fue el que presentó valores más elevados. Para determinar las diferencias significativas se emplea el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, que observamos en la Figura 7.

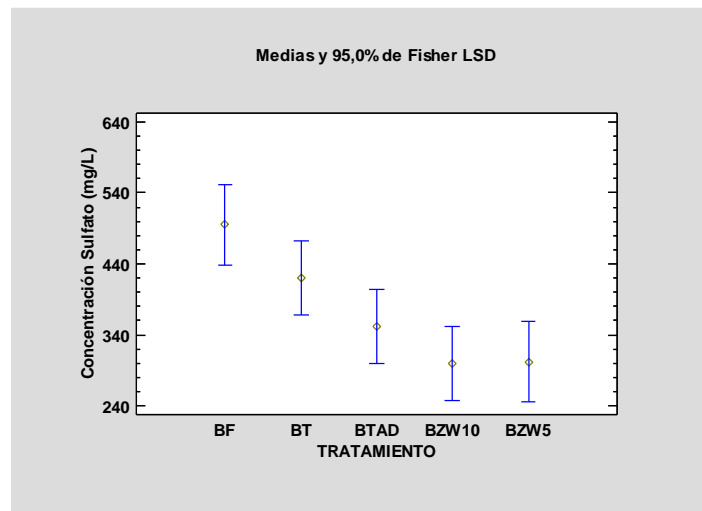


Figura 7. Gráfico de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, entre los distintos tratamientos para el Sulfato

La Tabla 13 nos muestra la concentración media de ácidos de cada muestra de vino tinto, observando que igual que en las muestras de vino blanco, el análisis de la varianza nos indica que solo hay un ácido significativo, aunque en este caso se trata del ácido tartárico.

Tabla 13. Concentración media de ácidos en cada muestra de vino tinto.

CONCENTRACIÓN MG/L EN EL VINO MEDIA DE TODOS LAS MUESTRAS	TINTO TESTIGO (n=6)	TINTO ADITIVO (n=6)	TINTO ZC 5 (n=6)	TINTO ZC 10 (n=6)	TINTO FRÍO (n=5)
SULFATO	389 ± 44	427 ± 67	398 ± 54	406 ± 150	534 ± 124
TARTÁRICO	2004 ± 90 ^a	1956 ± 135 ^a	1996 ± 123 ^a	1849 ± 169 ^a	2220 ± 228 ^b
MÁLICO	47 ± 221	28 ± 17	38 ± 54	16 ± 53	51 ± 66
CÍTRICO	205 ± 38	200 ± 34	217 ± 15	162 ± 67	218 ± 17
SUCCÍNICO	801 ± 46	770 ± 117	829 ± 83	805 ± 83	630 ± 439
LÁCTICO	1669 ± 86	1668 ± 128	1562 ± 585	1612 ± 137	1794 ± 161
FOSFÓRICO	523 ± 80	486 ± 104	484 ± 140	456 ± 92	593 ± 136
GLUCÓNICO	877 ± 68	868 ± 37	850 ± 72	767 ± 173	855 ± 89

Letras superíndices: presentaron medias significativamente distintas para los diferentes tratamientos

n = nº de muestras analizadas para cada tratamiento

Puesto que el valor-P es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa, con un 5% de significación, del ácido tartárico con respecto a los distintos tratamientos. El método empleado es el mismo que en el vino blanco; el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, donde se muestran estas diferencias significativas entre Tinto Frío y el resto de tratamientos, con un nivel del 95,0% de confianza.

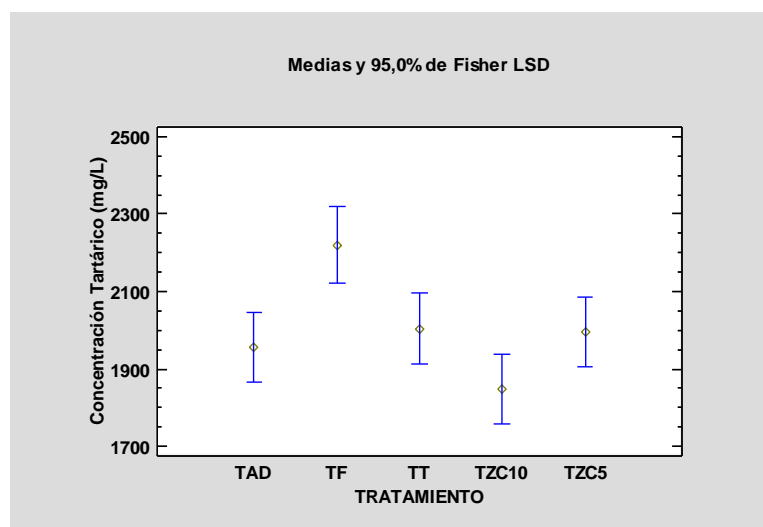


Figura 8. Gráfico de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, entre los distintos tratamientos para el Tartárico

En total, se determinaron ocho ácidos, incluidos el ácido sulfúrico, tartárico, málico, láctico, cítrico, succínico, fosfórico y glucónico.

El ácido *tartárico* fue el compuesto dominante tanto en vino tinto como en blanco. Su contenido en vinos blancos osciló entre 2 y 2,2 g/L y en los vinos tintos contenían entre 1,8 y 2,2g/L. El ácido tartárico, que influye en gran medida en la acidez de los vinos, estuvo presente en una cantidad más alta en el vino con tratamiento con frío, tanto en vino blanco como tinto

El ácido *málico* oscilaba entre 0,55 y 0,70g/L para los vinos blancos y hasta y entre 0,01 y 0,05g/L para los vinos tintos. En nuestro estudio, los vinos blancos contenían concentraciones relativamente altas de ácido málico y concentraciones relativamente bajas de ácido láctico, lo que significa que la fermentación maloláctica no se completó en estas muestras. Mientras que en el vino tinto ocurría lo contrario, se cuantificaron concentraciones de ácido málico, que se convirtió casi por completo en ácido láctico como resultado de la fermentación maloláctica. Por lo tanto, el contenido de ácido láctico en vinos blancos está entre 0,16 y 0,24g/L, mientras que en vinos tintos está entre 1,5 y 1,8g/L.

El ácido *cítrico* estaba presente en concentraciones más altas en los vinos blancos (0,28 – 0,35g/L) en comparación con los vinos tintos (0,16 – 0,21g/L). Todos los vinos tratados contenían concentraciones de ácido cítrico inferiores a 1g/L, de acuerdo con las regulaciones de la Organización Internacional de la Viña y el Vino. [31]

El ácido *succínico*, que es un subproducto del metabolismo de la levadura durante la fermentación, con un sabor salado y amargo, se encontró en bajas concentraciones en los vinos tintos y blancos entre 0,60 – 0,83g/L para ambos vinos.

En general, los vinos analizados contenían ácidos orgánicos en cantidades que están principalmente relacionadas con las variedades, pero también en cierta medida con los procedimientos de vinificación aplicados. Además, los contenidos ácidos eran lo suficientemente altos como para asegurar una acidez adecuada de los vinos, lo cual es necesario para su estabilidad química y microbiológica, y especialmente importante para las características sensoriales y el envejecimiento de los vinos. Los resultados obtenidos para los ácidos orgánicos (tartárico, málico y láctico) de dichos vinos fueron similares estudios publicados previos [4], [32].

En cuanto al Zenith White®, no podemos concluir que a distintas dosis aumente o no la concentración de ácidos en el vino, y siendo datos también parecidos a las muestras con aditivo, es decir, sin el poliaspartato, podemos concluir que el poliaspartato no influye en la fracción acida del

vino. Observamos que el tratamiento por frío influye aumentando la concentración de ácidos, esto puede ser debido a que, al no añadir ningún compuesto, no interfiere en la composición del vino.

Por otro lado, con el Zenith Color® ocurre lo mismo que en vinos blancos, hay cierta similitud con el resto de muestras, por lo que no podemos concluir que influya en la concentración de ácidos en el vino. Al igual que ocurre en vinos blancos, observamos que el tratamiento por frío influye aumentando la concentración de ácidos a excepción del ácido succínico que la disminuye.

Todo dependerá de las características que queramos conseguir en el vino, para usar un tratamiento u otro, ya que realmente ninguno afecta de forma negativa en el vino.

5. CONCLUSIONES

Después de los estudios realizados para los distintos tratamientos, en vino blanco, podemos observar que los vinos tratados con Zenith White® a dosis de 10g/hL presentan una estabilidad elevada. Sin embargo, los vinos sometidos durante una semana a 4°C fueron inestables, por lo que, como mínimo, sería necesario aumentar el tiempo de este tratamiento.

La adición de poliaspartato mejora la estabilidad. Sin embargo, la adición únicamente de goma arábica y CMC, en ausencia de poliaspartato también estabiliza el vino, por lo que podemos determinar que el aspartato solo mejora la estabilidad si es a dosis de 10g/hL o superiores.

En vino tinto, todos los tratamientos fueron efectivos para su estabilización, a diferencia del vino blanco ninguna muestra presenta inestabilidad. Siendo los vinos tratados con poliaspartato, es decir, con el producto Zenith Color®, los que mayor estabilidad consiguieron.

Las características generales como pH, acidez, densidad no se ven afectadas por ningún tratamiento, ya que los resultados son similares.

Los polifenoles totales no tienen casi variaciones después de tratar el vino, y las características cromáticas apenas se ven influenciadas por los tratamientos en ningún tipo de vino, por lo que podemos determinar que el poliaspartato no afecta a la composición cromática de los vinos tratados

Por todo ello, sería necesario observar durante más tiempo la evolución de estos vinos para una evaluación más detenida.

Los resultados relacionados con la electroforesis capilar, presentados en este trabajo demuestran que es una técnica resolutive para el análisis de ácidos en muestras de vino blanco y tinto, proporcionando separaciones simples de forma rápida, eficiente y simultánea. Encontramos diferencias significativas para el ácido sulfúrico en vino blanco y ácido tartárico en vino tinto, frente a los distintos tratamientos realizados. Estos resultados se pueden atribuir a las características varietales y también a las prácticas de vinificación. Ningún tratamiento influye de manera negativa sobre la fracción ácida de los vinos, ya que se observan bastantes similitudes, por lo que no podemos concluir que el producto Zenith White® y Zenith Color® influya en la concentración de ácidos en el vino.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] BOE, *Ley 24/2003, de 10 de julio, de la Viña y del Vino*. España, 2003, pp. 27165–27179.
- [2] M. Martelo Vidal, “Desarrollo de métodos rápidos basados en Espectroscopía UV-VIS-NIR para el análisis de vinos,” Universidad de Santiago de Compostela, 2014.
- [3] V. Fernández, M. Berradre, B. Sulbarán, G. Ojeda de Rodríguez, and J. Peña, “Caracterización química y contenido mineral en vinos comerciales venezolanos,” *Revista de la Facultad de Agronomía*, vol. 26, no. 3, pp. 382–397, 2009.
- [4] K. Tasev, M. Stefova, and V. Ivanova-Petropulos, “HPLC method validation and application for organic acid analysis in wine after solid-phase extraction.,” *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering.*, vol. 35, no. 2, pp. 225–233, 2016.
- [5] A. B. Casares Faulín, “Análisis de polifenoles en los vinos mediante técnicas de separación.,” Universidad Politécnica de Catalunya, 2010.
- [6] D. Sanz Sanz and J. M. Rodríguez Nogales, “Revisión sobre técnicas actuales de estabilidad tartárica en los vinos.,” Universidad de Valladolid - Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias de Palencia, 2012.
- [7] P. Martínez Pérez, A. B. B. Ortín, V. Durand, and E. Gómez Plaza, “Reemplazo de la estabilización tartárica por frío en las bodegas: El uso de carboximetil celulosa, poliaspartato de potasio y resinas intercambiadoras de iones.,” *BIO Web Conf. - 41st World Congr. ofVine Wine.*, vol. 12, 2019.
- [8] GAB - Sistemas Analíticos, “Criotermostato con agitador para ensayo de vinos. Medida de la estabilidad tartárica de los vinos por el test de Boulton.”
- [9] R. Guise, L. Filipe-Ribeiro, D. Nascimento, O. Bessa, F. M. Nunes, and F. Cosme, “Comparison between different types of carboxymethylcellulose and other oenological additives used for white wine tartaric stabilization.,” *Food Chem.*, vol. 156, pp. 250–257, 2014.
- [10] L. Cambroneró González, “Estabilización tartárica y colorante en vinos tintos,” Universidad de la Rioja, 2017.
- [11] J. Iniesta Ortiz and E. Ramírez Carrera, “La goma arábiga en el vino.,” *Vitucultura/Enología Prof.*, vol. 100, pp. 54–58, 2005.

- [12] R. López, E. Vela, P. Hernández Orte, and V. Ferreira, "Impacto del poliaspartato de potasio en la estabilidad tartárica y el aroma de los vinos.," 2012, pp. 248–251.
- [13] Enartis, "Zenith® White - Estabilizantes," La Rioja, 2018.
- [14] Enartis, "Zenith® Color - Estabilizantes," La Rioja, 2018.
- [15] Fundación para la cultura del vino, "Informe Técnico. Gestión de pH en el Vino de Calidad.," Madrid, 2005.
- [16] B. S. Chidi, F. F. Bauer, and D. Rossouw, "Organic acid metabolism and the impact of fermentation practices on wine acidity - A review," Stellenbosch University - South Africa, 2018.
- [17] M. Pérez Ausejo, "Seguimiento multivariante de la maduración de las uvas.," Universidad de Burgos., 2019.
- [18] M. Á. Romero Gamero and M. Blanco Romia, "Desarrollo de nuevas metodologías analíticas en el control de calidad de la industria farmacéutica.," Universidad Autónoma de Barcelona, 2002.
- [19] C. Catania and S. Avagnina, "La maduración de la uva," *Curso Super. Degustación Vinos*, 2007.
- [20] J. F. Cacho Palomar, "El vino, su composición y nuestros sentidos.," Zaragoza, 2003.
- [21] J. Zeravik *et al.*, "Various instrumental approaches for determination of organic acids in wines," *Food Chem.*, vol. 194, pp. 432–440, 2016.
- [22] A. Castiñeira, R. M. Peña, C. Herrero, and S. García-Martín, "Analysis of organic acids in wine by capillary electrophoresis with direct UV detection.," *J. Food Compos. Anal.*, vol. 15, no. 3, pp. 319–331, 2002.
- [23] S. Ruiz Marrondo, "Desarrollo de métodos de electroforesis capilar en fase micelar. Aplicación al análisis de herbicidas y de sus productos de degradación," Universidad Politécnica de Catalunya, 2001.
- [24] OIV, *Determinacion de los principios ácidos orgánicos de los vinos por electroforesis capilar*. 2006.

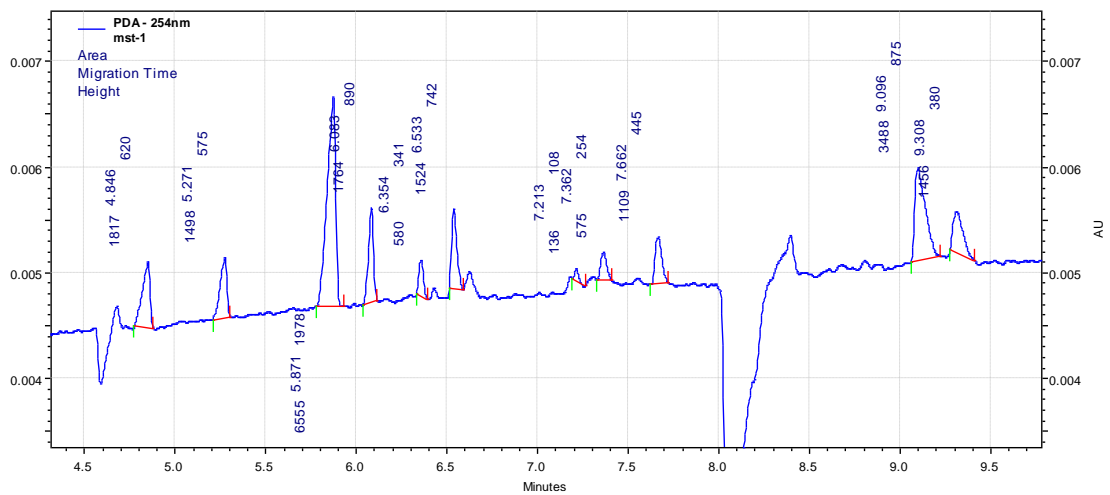
- [25] I. Lacunza Aguirrebengoa, "Desarrollo de métodos de electroforesis capilar para el análisis de formas de glicoproteínas de interés farmacéutico y clínico.," Universidad Autónoma de Madrid, 2006.
- [26] M. Cañibano Alberola, "Efecto del perfil fenólico sobre las características antioxidantes de vinos tintos.," Universidad de Valladolid - Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias de Palencia, 2012.
- [27] O. Durán, S. Daniel, N. Trujillo, and N. Yanine, "Estudio comparativo del contenido fenólico de vinos tintos colombianos e importados.," *VITAE, Rev. la Fac. Química Farm.*, pp. 17–24, 2008.
- [28] "Método oficial de determinación del color del vino .," Universidad de la Rioja.
- [29] M D. Esteve Rodríguez, "Química Enológica," Universidad Politécnica de Valencia., 1999.
- [30] OIV, "Método para la determinación de sulfato en Iso vinos mediante electroforesis capilar.," 2011.
- [31] OIV, *Código Internacional de Prácticas Eológicas.*, vol. 33. 2016.
- [32] S. Rovio, K. Sirén, and H. Sirén, "Application of capillary electrophoresis to determine metal cations, anions, organic acids, and carbohydrates in some Pinot Noir red wines.," *Food Chem.*, vol. 124, no. 3, pp. 1194–1200, 2011.

7. ANEXO

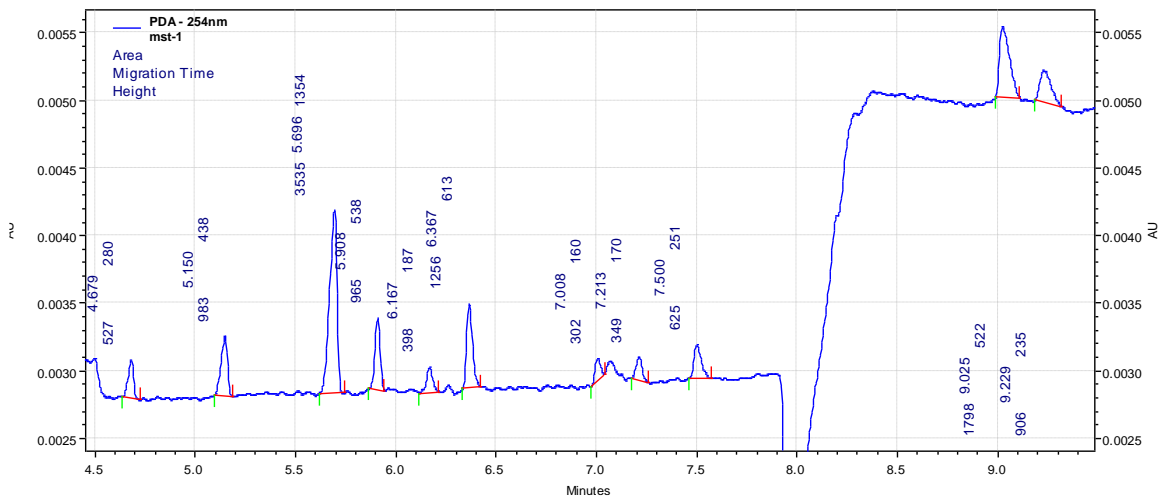
En este apartado, se representan los distintos electroforegramas para cada tratamiento, se muestra el electroforegrama correspondiente a la muestra óptima, es decir, aquella en la que se observa una mejor separación entre los picos de las áreas. Se muestran los electroforegramas tanto para vino blanco como para vino tinto

4.1.1 Electroforegramas vino blanco.

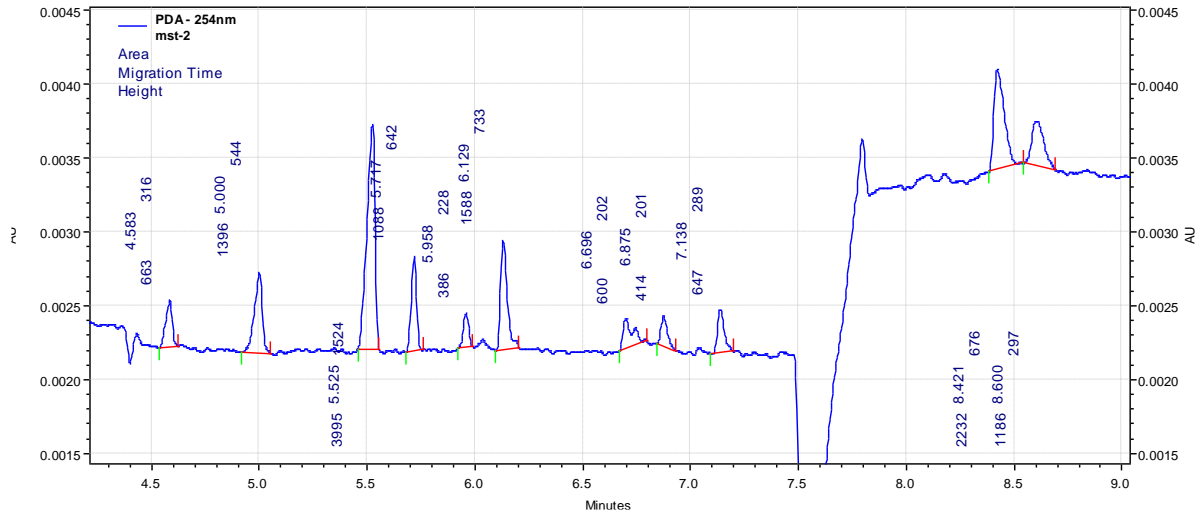
- Testigo



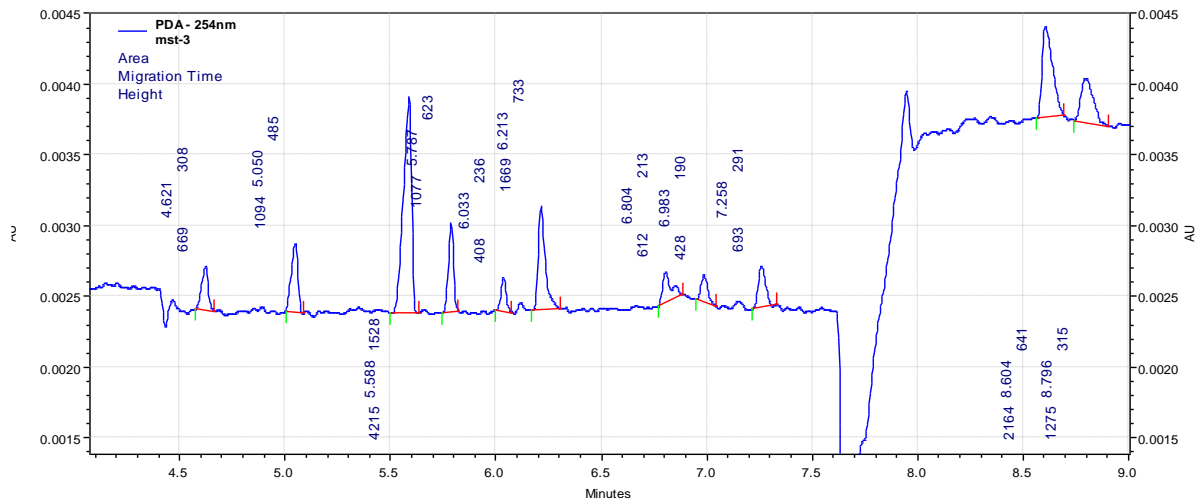
- Aditivo (goma arábica + CMC)



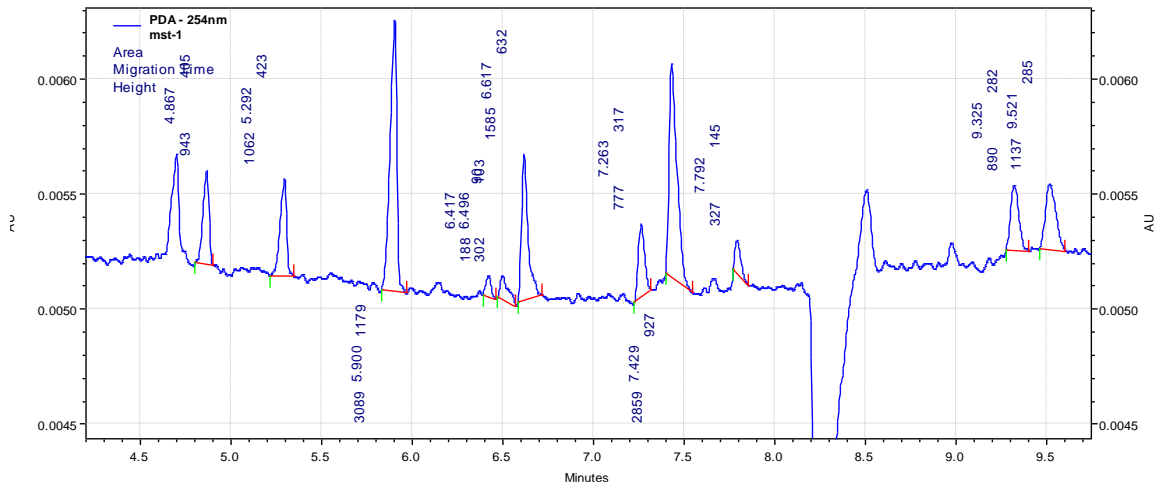
- Zenith White® 5g/hL



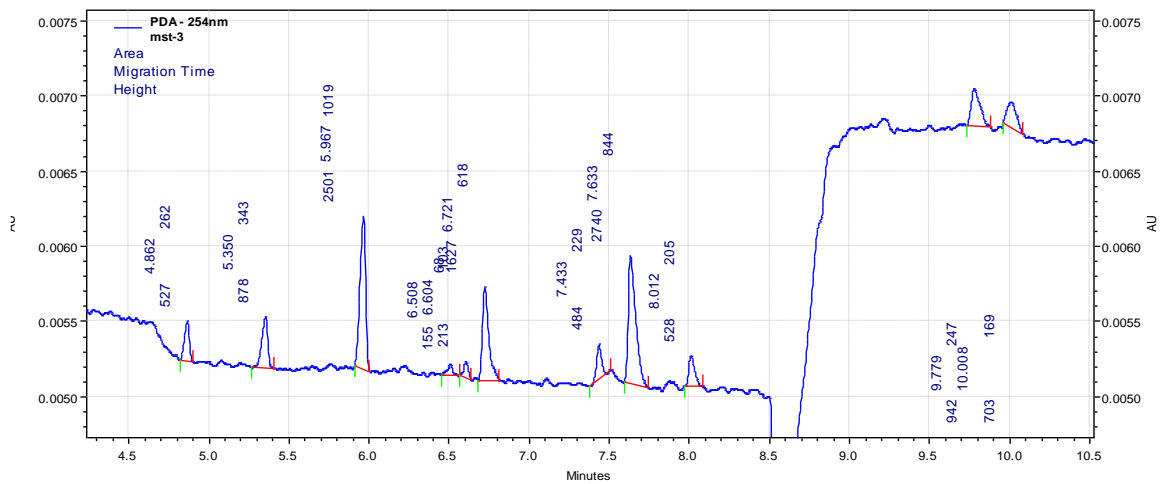
- Zenith White® 10g/hL



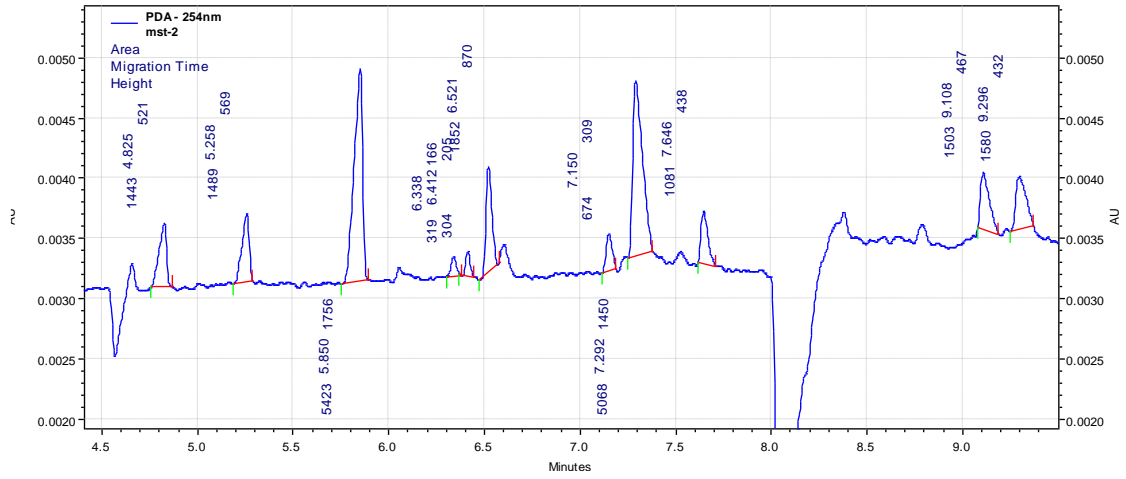
- Aditivo (goma arábica)



- Zenith Color® 5g/hL



- Zenith Color® 10g/hL



- Frío

