



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Biotecnología

Reporte para la obtención del grado de:

Especialidad en Biotecnología

“Extracción y Determinación de Compuestos Fenólicos en un Vino Modelo
Adicionado con Chips de Madera de Roble”

Presenta

I.A. Daniela Moreno Mena

Director

Dr. José Ramón Verde Calvo

Lector

Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía

Departamento de Biotecnología

Septiembre 2019

Resumen

El añejamiento de los vinos en madera actualmente está cambiando, los costos de las barricas y su tiempo de vida útil han provocado nuevos métodos y tecnologías, como la adición de chips de madera están siendo cada vez más estudiados, por lo que el objeto de esta tesis, es separar, identificar y cuantificar parcialmente, los diversos compuestos fenólicos presentes en un vino modelo, extraídos durante 26 días en añejamiento con chips de madera de roble americano con tostado medio; así mismo realizar un estudio descriptivo de cromatografía, en donde la hipótesis central planteada fue la siguiente: “Las diferentes concentraciones de grado alcohólico, acidez, pH, metabisulfito de potasio y cantidad de chips, tendrán influencia en la cantidad de compuestos fenólicos extraídos de la madera hacia el vino, y por consecuencia, tendrán efecto en el color del mismo”.

El vino modelo fue diseñado con características de un vino blanco, tanto en grado de alcohol, pH y ppm de sulfuroso, con el fin de tener mayor claridad en los resultados de la extracción de los compuestos fenólicos que fueron separados cromatográficamente, sin la influencia de los pigmentos, aromas y taninos que aporta el hollejo de una uva tinta. Se propuso un diseño factorial de 2^{K-1} que se realizó con 4 factores diferentes a 2 niveles, esto para explicar cómo diferentes concentraciones de cada factor influyen positivamente en la cantidad de polifenoles extraídos y parámetros de color. Se usó ANOVA (Analysis of Variance) para determinar si hubo diferencia significativa entre las condiciones evaluadas. De este modo, al final del periodo de extracción de polifenoles, en el día 26, resultó que la C4 (condición 4) fue la más eficiente obteniendo un total de 27.0 mg/L, mientras que en los descriptores de color, se lograron resultados positivos, logrando demostrar que el modelo de la C4, no produce cambios significativos en el color del vino.

Se separaron un total de 9 compuestos fenólicos, y se identificaron y cuantificaron parcialmente 3 de ellos: ácido gálico, ácido siríngico y furfural.

Por lo que respecta al añejamiento del vino modelo, los resultados señalan que se puede reducir tiempo de añejamiento con una extracción de compuestos fenólicos importante y significativo, bajo las condiciones de concentración de la C4, es decir; 14% (v/v) de etanol, 100 (ppm) de metabisulfito de potasio, pH 3 y 3 (g/L) de chips de madera. Los factores que influyeron significativamente para que estos resultados fueran positivos son; acidez, grado alcohólico y cantidad de chips de madera.

ÍNDICE

Resumen.....	2
1. Introducción.....	4
2. Antecedentes.....	5
3. Justificación	6
4. Hipótesis.....	7
5. Objetivo General.....	7
5.1. Objetivos Específicos.....	7
6. Metodología	8
6.1. Diseño Experimental de 2^{K-1}	8
6.2. Elaboración del Vino.	10
6.3. Análisis de fenoles totales.....	10
6.4. Análisis de cromaticidad.....	12
6.5. Separación, identificación parcial y cuantificación de compuestos fenólicos.....	13
7. Resultados y Discusión.....	14
8. Conclusiones.....	26
9. Referencias	27

1. Introducción

El vino es un sistema complejo capaz de experimentar cambios durante su envejecimiento, ya sea usando barrica o chips de madera. La influencia de estas modificaciones, tienen efecto en su calidad y valor económico. El conjunto de fenómenos implicados en la interacción vino - madera - aire durante la crianza dependen de las propiedades estructurales y características químicas de la madera, así como las características del vino (M.A.Gómez Gallego *et al.*, 2013).

La madera y el vino siempre han tenido una estrecha relación. A través de los siglos se han ido conociendo las bondades de este material y las modificaciones que este genera.

En los últimos años se ha empleado el uso de chips de madera debido a sus diversas ventajas, entre las cuales se acentúan, el uso del área total de la madera, el bajo costo y la rápida extracción de los compuestos presentes en la madera hacia el vino (Hernández Carpia M., 2016, Ortíz J., 2015). Dentro de los compuestos presentes en la madera, están incluidos los fenólicos que se extraen durante el añejamiento del vino. Durante su estancia en barrica de roble, la extracción de compuestos fenólicos ha demostrado que se rige por la cinética de difusión, siguiendo una curva en la que la tasa de extracción es inicialmente alta, debido a una gran diferencia de concentraciones entre el cuerpo de la barrica y el vino, pero ésta disminuye conforme a la concentración de los compuestos en el vino más cercana a la superficie interior del barril, como lo demostraron Towey & Waterhouse en 1996, las concentraciones de compuestos de roble, tales como los fenoles totales y los volátiles como la vainillina, siguen este patrón general de extracción.

Para comprender la clasificación y estructura química de los compuestos fenólicos es importante comenzar por definir qué es un fenol. Un fenol es una molécula básica en el sistema del vino (Figura 1). El fenol se compone de un anillo aromático (fenil) unido a un grupo funcional hidroxilo (OH). La presencia de este anillo aromático hace que los ácidos débiles, generen un efecto inductivo en el hidrógeno del grupo funcional hidroxilo, este anillo aromático juega un papel muy importante para las propiedades antioxidantes.

El uso de Chips de madera de roble Americano con tostado medio especie (*Quercus alba*), cuenta con una mayor densidad y resistencia, así como una menor porosidad y permeabilidad. Es más rico en vainillina y lactonas, a diferencia del roble Francés. También se incrementan los contenidos de polifenoles derivados de la degradación de la lignina (aldehídos fenólicos) y de la de algunos lípidos (whisky lactonas). El tostado de la madera, intensifica el potencial aromático, ya que conlleva la

degradación térmica de la capa superficial interna y generación de nuevos compuestos aromáticos (Araptisas et al., 2004).

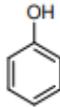


Figura 1. Estructura química del Fenol.

Durante la madurez del vino en barrica de roble, la composición de los compuestos fenólicos se ven modificados como resultado de la transferencia de masa en la interfase madera – vino. Entre los diferentes compuestos fenólicos presentes en el vino, las antocianinas contribuyen a la estabilidad del color del vino. La mayoría de estos polifenoles son muy inestables y se transforman rápidamente en varios pigmentos, produciéndose las reacciones de polimerización y oxidación durante el proceso de madurez de los vinos. (Rivera M.S. 2005).

A lo largo de la maduración, utilizando Chips de madera de Roble Americano, algunos de los compuestos que se transfieren desde la madera hasta el vino son: elagitaninos, lactonas, cumarinas, polisacáridos, hidrocarburos, ácidos grasos, terpenos, norisoprenoides, esteroides, carotenoides y furanos. Sin embargo, los taninos hidrolizables, son los principales polifenoles que libera la madera, éstos juegan un papel muy importante en el agrado del vino, los polisacáridos confieren astringencia, estructura y estabilización del color en el producto (Puech *et al.*, 1999). Esta transferencia produce una difusión lenta de oxígeno en el vino a través de la madera, favoreciendo la oxidación suave en los que están implicados especialmente compuesto fenólicos propios del vino como antocianos, otros flavonoides y ésteres tartáricos de los ácidos hidroxicinámicos y los aportados por la madera, como elagitaninos y polifenoles derivados de la lignina.

Las consideraciones cinéticas utilizadas en esta investigación constituyen una importante contribución al estudio y aplicación de la extracción sólido - líquido en vinos. Ésta depende de las condiciones físico - químicas de pH, temperatura, concentración de sulfuroso y cantidad de chips de madera.

2. Antecedentes

En los últimos años se ha ido introduciendo al proceso de maduración del vino la técnica con chips de madera, la cual consiste en agregar piezas nuevas de madera (chips o duelas de roble) en los contenedores de vino. Esta técnica ofrece un sabor distinto y varias ventajas, así como nuevas opciones en el manejo del vino dado que la madera es colocada directamente en el vino, toda la superficie se puede utilizar y no solo el 40% de la misma, como lo es con el uso de barrica. El resultado de dicha técnica es una aplicación atractiva que está siendo adoptada por muchos (Sanz M. *et al.*, 2010).

Existen diferentes formas o presentaciones de piezas de madera de roble que se pueden encontrar en el mercado, tales como: chips, cubos, granos, polvo, virutas o granulados, dominó y los bloques o segmentos (Figura 2.). Factores como el tamaño de la pieza, la cantidad y tipo de madera añadida y el tiempo de contacto entre la madera y el vino, tendrán influencia sobre los compuestos que se extraen, así como en las características sensoriales y químicas del vino (Sanz M. *et al.*, 2010).



Figura 2. Representación de las diferentes formas de madera de roble que existe para el uso de madurez del vino.

La rápida difusión del uso de los chips de madera requiere de más estudios para evaluar su influencia, llevar a cabo la caracterización fisicoquímica de los vinos y evaluar las diferencias respecto a los sistemas tradicionales de añejamiento, es por ello que esta investigación es complementaria del trabajo de tres jóvenes investigadores que estudiaron la influencia de los chips de madera en vino tinto (Espitia López, 2015), vino rosado (Hernández Carapia, 2016), y vino blanco (Ortiz Hernández, 2019 tesis en proceso).

3. Justificación

Este proyecto es parte del estudio general sobre el uso de chips de madera y su aplicación en la elaboración de vinos de mesa, investigación que se viene realizando en el laboratorio de Enología de la UAM Iztapalapa desde hace más de un lustro.

Se conocen los efectos benéficos sobre la salud de la ingesta de alimentos y bebidas que contienen relativamente altas concentraciones de flavonoides (S. Martínez-Flórez., *et al* 2002). Se han demostrado múltiples efectos positivos debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres, por lo que mediante la determinación e identificación de estos compuestos fenólicos presentes en el vino modelo, podremos tener mayor claridad de cuáles se extraen y provienen de la madera así, los resultados de este estudio complementarían la caracterización físico-química de los compuestos que aportan al vino los chips de madera, que también permitirán ahorrar dinero, espacio, tiempo, durante el añejamiento del vino.

4. Hipótesis

Las diferentes concentraciones de grado alcohólico, acidez, pH, metabisulfito de potasio y cantidad de chips, tendrán influencia en la cantidad de compuestos fenólicos extraídos de la madera hacia el vino, y por consecuencia, tendrán efecto en el color del mismo.

5. Objetivo General

Estudiar la influencia del grado alcohólico, acidez, pH y metabisulfito de potasio en la extracción de compuestos fenólicos contenidos en los chips de madera de roble americano utilizando un vino modelo.

5.1. Objetivos Específicos

- Estudiar el efecto de la adición de chips de madera de roble en un vino modelo en la extracción de los compuestos fenólicos del mismo.
- Estudiar la influencia de las variables de acidez, metabisulfito y alcohol en la extracción utilizando un diseño experimental de 2^{K-1} con dos repeticiones.
- Estudio del efecto de la madurez del vino modelo en los cambios de color (cromaticidad) de cada sistema de extracción.
- Separación e identificación de los compuestos de mayor concentración y cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en el sistema por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

6. Metodología

6.1. Diseño Experimental de 2^{K-1}

El análisis del diseño factorial de 2^{K-1} se realizó usando cuatro factores a dos niveles, arrojando un total de 8 condiciones diferentes por duplicado, es decir; 16 sistemas a diferentes condiciones.

	Factor	Nivel 1 Alto	Nivel 2 Bajo
A	Alcohol	14% (v/v)	10% (v/v)
B	Metabisulfito	100 ppm	50 ppm
C	pH	3.5	3
D	Chips de madera	3 g/L	1g/L

Condiciones	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Sistemas/Factores					Alcohol	SO ₂	pH	Chips
1	1	1	1	1	10	50	3	1
2	2	1	1	1	14	50	3	3
3	3	2	1	1	10	100	3	3
4	4	3	1	1	14	100	3	1
5	5	4	1	1	10	50	5	3
6	6	5	1	1	14	50	5	1
7	7	6	1	1	10	100	5	1
8	8	7	1	1	14	100	5	3
9	9	8	1	2	10	50	3	1
10	10	9	1	2	14	50	3	3
11	11	10	1	2	10	100	3	3
12	12	11	1	2	14	100	3	1
13	13	12	1	2	10	50	5	3
14	14	13	1	2	14	50	5	1
15	15	14	1	2	10	100	5	1
16	16	16	1	2	14	100	5	3

Figura 3. Matriz de diseño factorial con duplicado y con cuatro variables respuesta, arrojado por el análisis estadístico Minitab.

Después del diseño factorial 2^{K-1} , se procedió a la preparación de cada una de las 8 condiciones por duplicado variando en sus 4 factores elegidos: grado de alcohol, SO₂, pH y chips con tostado medio.

Se tomaron muestras de las 8 condiciones a lo largo de los 26 días de extracción, según la Tabla 1, para el análisis de Fenoles Totales (FT).

Tiempo de madurez	Fecha de muestreo (2018)	Análisis
Día 0	-	-
Día 1	14 mayo	Fenoles Totales (Folin Cioalteau), (Cromaticidad)
Día 2	15 mayo	Fenoles Totales (Folin Cioalteau), (Cromaticidad)

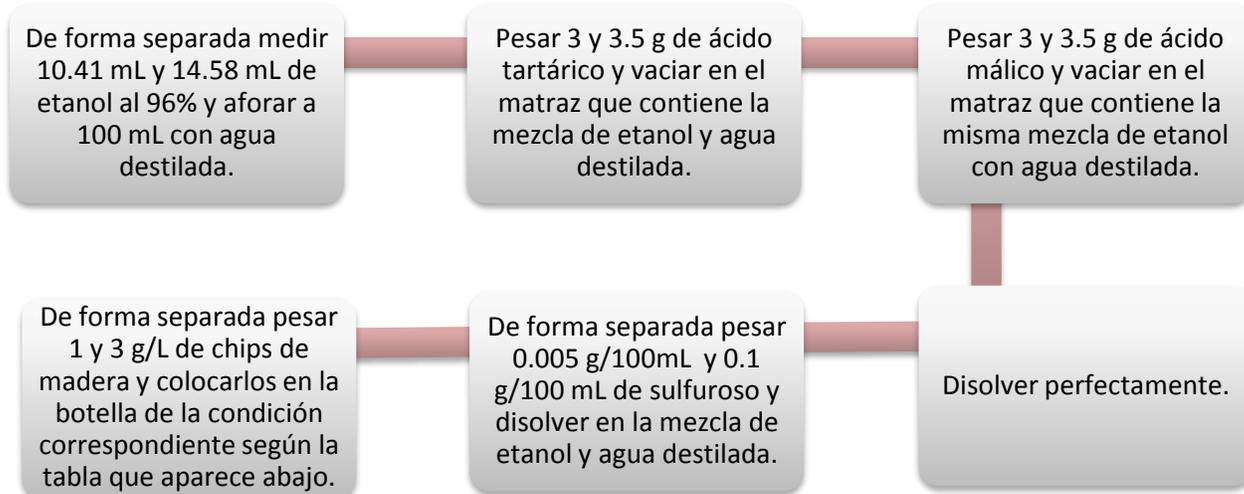
Día 3	16 mayo	Fenoles Totales (Folin Ciocalteu), (Cromaticidad)
Día 4	17 mayo	Fenoles Totales (Folin Ciocalteu), (Cromaticidad)
Día 5	18 mayo	Fenoles Totales (Folin Ciocalteu), (Cromaticidad)
Día 8	21 mayo	Fenoles Totales (Folin Ciocalteu), Compuestos fenólicos (HPLC), (Cromaticidad)
Día 10	23 mayo	Fenoles Totales (Folin Ciocalteu), (Cromaticidad)
Día 12	25 mayo	Fenoles Totales (Folin Ciocalteu), (Cromaticidad)
Día 15	28 mayo	Fenoles Totales (Folin Ciocalteu), Compuestos fenólicos (HPLC), (Cromaticidad)
Día 17	30 mayo	Fenoles Totales (Folin Ciocalteu), (Cromaticidad)
Día 19	01 junio	Fenoles Totales (Folin Ciocalteu), (Cromaticidad)
Día 26	08 junio	Fenoles Totales (Folin Ciocalteu), Compuestos fenólicos (HPLC), (Cromaticidad)

Tabla 1. Toma de muestras a los largo de los 26 días de extracción.



Figura 4. Sistema de 8 condiciones diferentes de vino modelo, (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 y C8).

6.2. Elaboración del Vino.



Las condiciones finales en las que quedaron preparadas las 8 botellas es la siguiente:

Condición	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Etanol % (v/v)	10	14	10	14	10	14	10	14
SO ₂ (ppm)	50	50	100	100	50	50	100	100
pH	3	3	3	3	3.5	3.5	3.5	3.5
Ác. Tartárico (g/L)	3.0	3.0	3.0	3.0	3.5	3.5	3.5	3.5
Ác. Málico (g/L)	3.0	3.0	3.0	3.0	3.5	3.5	3.5	3.5
Chips de madera (g/L)	1	3	1	3	3	1	3	1
Vol. Total	100 mL							

Tabla 2. Condiciones de las 8 (botellas) a realizar la extracción de compuestos fenólicos.

6.3. Análisis de fenoles totales.

Los compuestos fenólicos son importantes por diversas razones, estos proporcionan color al vino, sabor astringente, son una reserva para la reducción del oxígeno y posiblemente, la causa de los olores picantes (M. A. Amerine, Cornelius S. Ough, 1976).

Para realizar la medición de los fenoles totales se requirió de lo siguiente:

Material e instrumentación:

- Espectrofotómetro UV-Visible. (Thermo Scientific TM).
- Balanza analítica. (Velab, México).
- Matraces volumétricos de 10 mL.
- Tubos de ensaye de 10 mL
- Pipetas de 1, 5 y 10 mL, micro- pipetas y puntas.

Reactivos químicos:

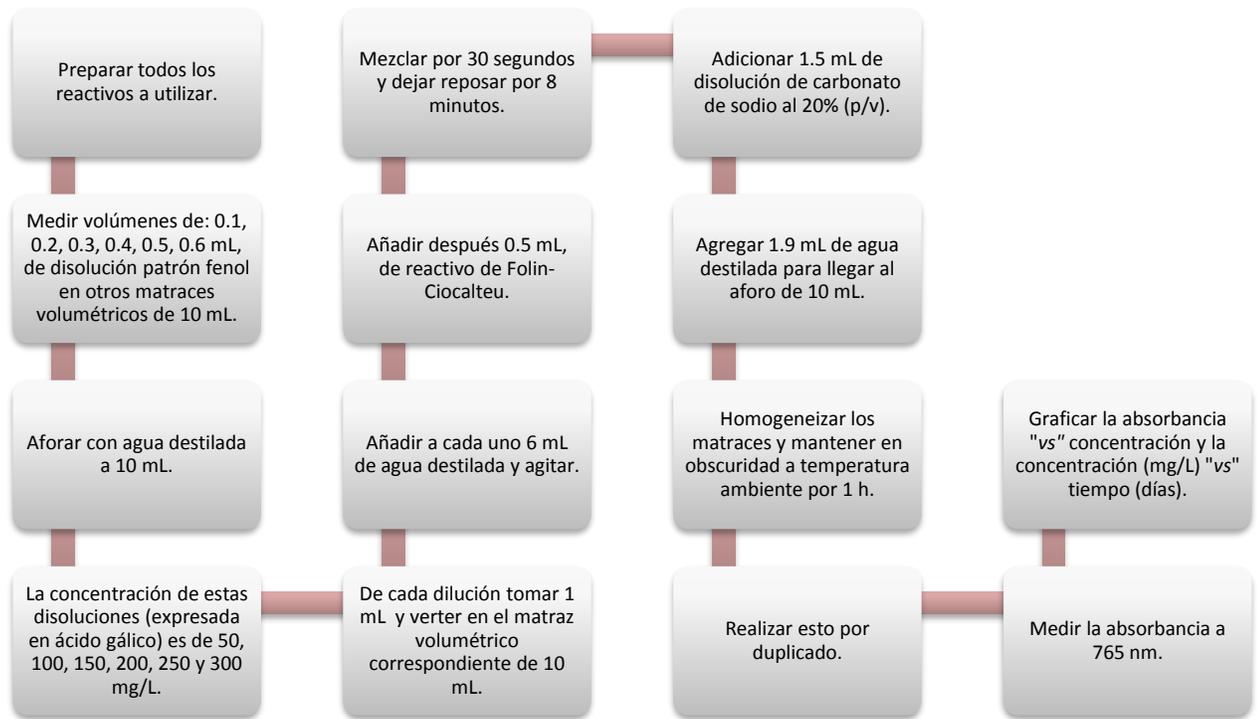
- Ácido gálico [500mg/L]. En un matraz volumétrico de 100 mL se disolvieron en agua 0.500 g de ácido gálico. (SIGMA – ALDRICH, USA).
- Agua destilada
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico). (SIGMA – ALDRICH, USA).
- Carbonato de sodio al 20% p/v (disolución de Na_2CO_3 se disolvieron 200 g de carbonato de sodio anhidra en 1L de agua recientemente hervida y enfriada a temperatura ambiente). (SIGMA – ALDRICH, USA).

Procedimiento para la curva de calibración:

El análisis partió de la calibración del equipo, usando un blanco con la misma preparación que las muestras que a continuación se describen, sin agregar el ácido gálico.

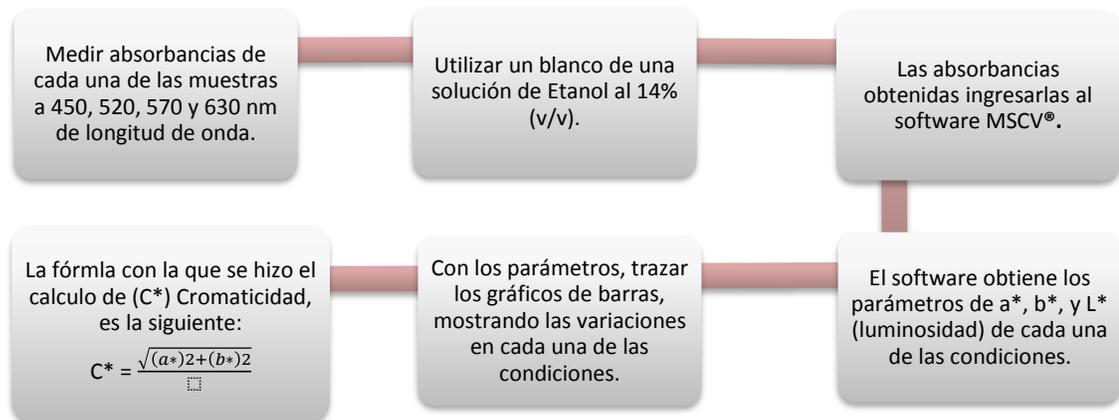
Con la solución patrón de ácido gálico de 500 mg/L, se procedió a realizar una serie de diluciones con agua destilada para obtener concentraciones de 50, 100, 150, 200, 250 y 300 mg/L. Para esto, se colocaron en distintos matraces de 10 mL los siguientes volúmenes; 0.1 ,0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mL, es decir; 100, 200, 300, 400, 500 y 600 μL . De cada dilución, se tomaron 0.1 mL equivalente a 100 μL . A cada matraz se le adicionaron 6 mL de agua destilada, más 0.5 mL equivalente a 500 μL del reactivo de Folin Ciocalteu. Se agitaron y agregaron 1.5 mL equivalentes a 1500 μL de carbonato de sodio al 20% p/v. La mezcla se llevó a volumen final de 10 mL usando 1.9 mL de agua destilada, y se dejaron reposar por una hora. Finalmente, se tomó lectura en el espectrofotómetro UV a 765 nm.

Procedimiento para determinación de Fenoles Totales (FT):



6.4. Análisis de cromaticidad.

Se realizó el análisis de cromaticidad, tomando muestra 4 veces al mes de cada una de las 8 condiciones por triplicado, por lo que las muestras fueron tomadas 1 vez por semana los días 5, 12, 19 y 26 de la extracción.



6.5. Separación, identificación parcial y cuantificación de compuestos fenólicos.

Para la caracterización y cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó un análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con un cromatógrafo de la marca Agilent serie 1100 y el software ChemStation para LC y LC/MS Systems, acondicionado con un detector de arreglo de diodos a 280 nm; una columna ZORBAX SB-C18 (4.6 X 250 mm; 5 μ m). Se emplearon como eluyentes (Merk®, grado HPLC) Fase A: agua/ácido acético 98:2 (v/v) y Fase B: metanol. Con un flujo de 0.8 mL/min. Los eluyentes se filtraron con membranas de teflón y/o nylon de 0.4 micras. La temperatura de la columna fue de 25°C. El análisis tuvo una duración de 10 minutos, y la determinación se realizó por el método del patrón externo mediante curvas estándar de compuestos puros, cabe mencionar que la metodología fue tomada de Espítia, J., (2015); sin embargo, se realizaron cambios en el gradiente empleado, ajustándolo de la siguiente manera: 0 min 5% B, 10 min 35% B. Se identificaron aquellos compuestos cuyo tiempo de elución fue menor a los 10 minutos. La caracterización o identificación parcial de los compuestos se realizó mediante la comparación de literaturas con estudios en vino añejado con chips de madera y mediante la inyección de estándares.



Figura 5. Cromatógrafo (HPLC) marca Agilent ChemStation con Detector de arreglo de diodos.



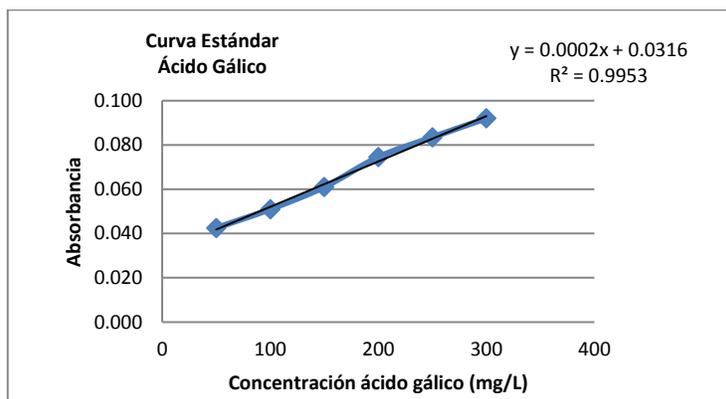
Figura 6. Columna ZORBAX SB-C18 (4.6 x 250 mm; 5 μ m).

Estándares:

- Ácido Gálico (SIGMA – ALDRICH, USA).
- Ácido Siríngico (SIGMA – ALDRICH, USA).
- Furfural (SIGMA – ALDRICH, USA).

7. Resultados y Discusión

1. Determinación de Fenoles Totales (FT) por el método espectrofotométrico de Folin Ciocalteu. (Hernández Carpia, M. 2016, Ortiz, A. 2019, Vernon L. Singleton., et al, 1999).



$$y = mx + b$$

$$y = 0.002x + 0.0316$$

$$x = (y - 0.0316) / 0.002$$

$$x = 0.0425 - 0.0316 / 0.002$$

m = 0.002
b = 0.0316

ABSORBANCIAS (765 nm)
0.043
0.051
0.061
0.075
0.084
0.092

Gráfico 1. Curva de calibración de ácido gálico con 6 puntos de concentración diferentes por triplicado.

CONDICION/DIA	TABLA DE FENOLES TOTALES DE LAS CUATRO SEMANAS DE ANALISIS [mg/L]											
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 8	Día 10	Día 12	Día 15	Día 17	Día 19	Día 26
C1	3.50	4.50	8.00	8.50	8.50	9.00	9.50	11.00	12.00	12.50	13.00	15.00
C2	1.00	3.50	4.00	6.00	6.50	8.00	11.00	13.50	14.50	15.50	15.50	16.50
C3	1.50	6.00	6.50	9.50	10.00	12.00	13.00	15.50	16.00	16.50	17.00	18.50
C4*	13.50	14.00	14.50	15.50	16.00	17.50	19.50	21.00	23.00	25.00	26.50	27.00
C5	4.00	5.50	7.50	8.00	8.60	9.50	10.00	10.50	10.70	11.00	11.50	12.50
C6	3.50	6.00	8.50	9.00	12.00	12.50	13.50	13.50	14.00	15.50	16.00	17.00
C7	6.00	9.00	9.00	9.50	10.00	13.00	14.00	14.50	15.00	15.00	17.00	18.00
C8	1.00	3.50	7.50	9.00	11.00	13.50	13.50	14.00	14.50	16.00	16.50	17.50

Tabla 3. Concentrado de fenoles totales a lo largo de los 26 días de extracción, destacando las 3 mejores condiciones, con mayor concentración de FT.

En la Tabla 3 se resaltaron, en color amarillo, las condiciones que extrajeron mayor cantidad de polifenoles durante los 26 días de añejamiento, es decir, las condiciones C3, C4 y C7, todas tienen en común las 100 ppm de SO₂ en su composición, pero se diferencian en la concentración del resto de los factores. Sin embargo, la

condición más eficiente para la extracción de compuestos fenólicos fue la C4, donde se obtuvieron 27.00 mg/L de fenoles totales.

La Tabla 4 muestra las 3 condiciones que resultaron ser más eficientes, describiendo su contenido de concentración por factor. Destaca que la C4 contiene mayor grado alcohólico a diferencia de las otras dos, por lo que se puede decir a este punto que el porcentaje de alcohol influye de manera sustantiva en la cantidad de extracción de polifenoles, al igual que en la acidez y en la cantidad de chips de madera adicionadas, ya que también influyen en la evolución del color del vino con el paso del tiempo.

Condición	C3	C4 *	C7
% (v/v) Etanol	10	14	10
(SO ₂) ppm	100	100	100
pH	3	3	3.5
Ác. Tartárico (g/L)	3.0	3.0	3.5
Ác. Málico (g/L)	3.0	3.0	3.5
Chips de madera (g/L)	1	3	3
Vol. Total (mL)	100	100	100

Tabla 4. Concentración y composición de las tres condiciones que más extrajeron polifenoles totales al final del periodo de extracción.

El gráfico 2 muestra que, entre cada condición, identificada con letras, existen diferencias significativas. En el gráfico 3 vemos cómo se incrementa cada día la concentración de fenoles totales de la C4 en donde, desde el día 1 se extrae un total de 13.50 mg/L y el último día 26 un total de 27.00 mg/L de FT.

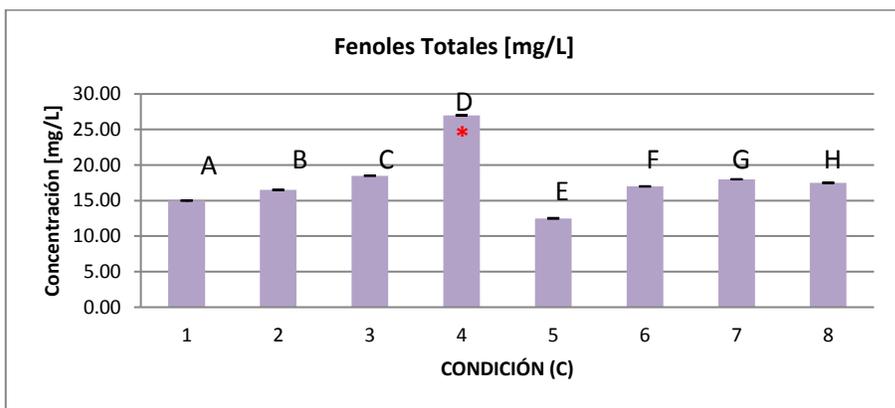


Gráfico 2. Concentración de fenoles totales (FT) vs número de condiciones durante los 26 días de extracción $\alpha < 0.05$ * Letras diferentes indican diferencia significativa de acuerdo a prueba de Fisher.

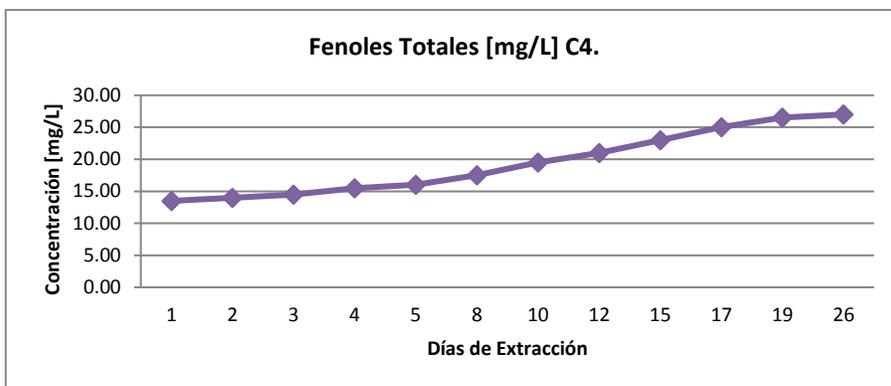


Gráfico 3. Concentración de fenoles totales (FT) vs los 26 días de extracción en la C4.

Durante el añejamiento con chips de madera, se cuidaron las condiciones de almacenamiento de los vinos modelo, se utilizaron botellas pequeñas color ámbar verdoso de 800 mL, con la menor cantidad de oxígeno posible circulante y pasó de luz para así, evitar oxidaciones por promotores agentes de oxígeno.

2. Determinación de color (cromaticidad) usando el software MSCV®.

Sabemos que la C4 (fila roja), fue la condición más eficiente en extracción de polifenoles y paralelamente en la Tabla 5 observamos que la C4 tiene poca influencia en la extracción de color, a diferencia del resto de las condiciones en comparación C3 y C7 visibles en las filas moradas como se muestra a continuación (*Konica Minolta, 2007*).

CONDICIONES	COLOR			SEMANA 4	
	a* (rojo-verde)	b* (amarillo-azul)	L* (blanco-negro)	C* (saturación)	ΔC*
1	-0.67	2.35	98.6	2.44	0.76
2	-2.3	3.27	98.7	4	-2.84
3	-1.63	0.58	99	1.73	-2.6
4	-1.94	3.72	99.3	4.2	-1.67
5	-3.27	3.77	98.7	4.99	-2.45
6	-3.26	3.72	98.8	4.94	-2.62
7	-4.39	3.57	98.1	5.66	-3.13
8	-1.63	2.4	99.4	2.9	-0.83

Tabla 5. Concentración de los datos finales del día 26 de extracción, se muestran los parámetros del espacio L* a* b* y C* para la determinación de cromaticidad de las 8 condiciones de vino modelo por triplicado.

Comparando las 3 condiciones C3, C4 y C7 en el parámetro (C*) de saturación, la C7 es la condición de más alta concentración de color con un resultado de C* 5.66 que supera a la C4 por lo cual, podríamos afirmar que ésta sería la condición con

mayor saturación de color al ser la condición con mayor extracción de polifenoles; sin embargo, esto no fue así como se expondrá más adelante.

En la Tabla 5 también se observa que la C7 se mueve en los colores verdes del parámetro (a^*) con un valor de -4.39, mientras que la C4 se mueve en los mismos colores que C7, pero con menor intensidad con un valor de -1.94, sin embargo, C4 obtuvo valores más altos y positivos moviéndose en los colores amarillos del parámetro (b^*) como podemos ver en los gráficos 4 y 5, esto significa que hubo una diferencia entre el valor final y el valor inicial de saturación.

Las 3 condiciones ya mencionadas, al paso de los días aumentaron su concentración de polifenoles, moviéndose en los colores amarillos, la C4 en menor concentración que la C7.

En la Tabla 5 también se observa de manera positiva que la condición que tiene mayor luminosidad fue la C4.

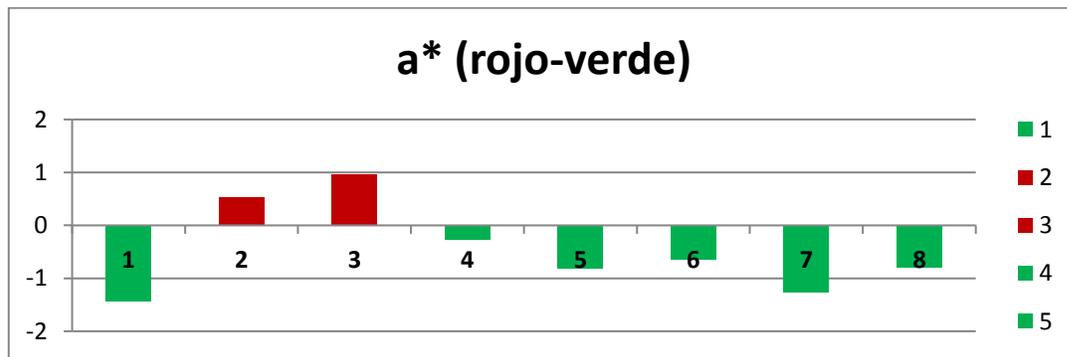


Gráfico 4. Gráfico de barras que muestra los colores en los que se mueven cada una de las 8 condiciones en el del parámetro (a^*) el día 26.

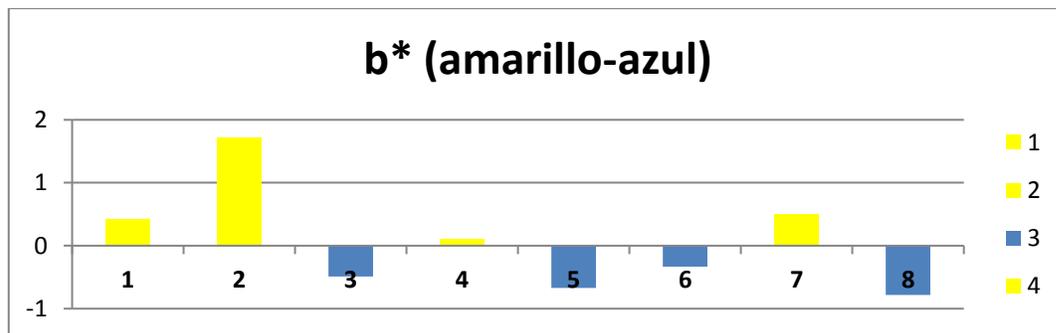


Gráfico 5. Gráfico de barras que muestra los colores en los que se mueven cada una de las 8 condiciones en el del parámetro (b^*) el día 26.

Para mayor claridad se muestran las siguientes figuras en donde se observa el espacio en el que se mueven los valores de color de cada condición en comparación:

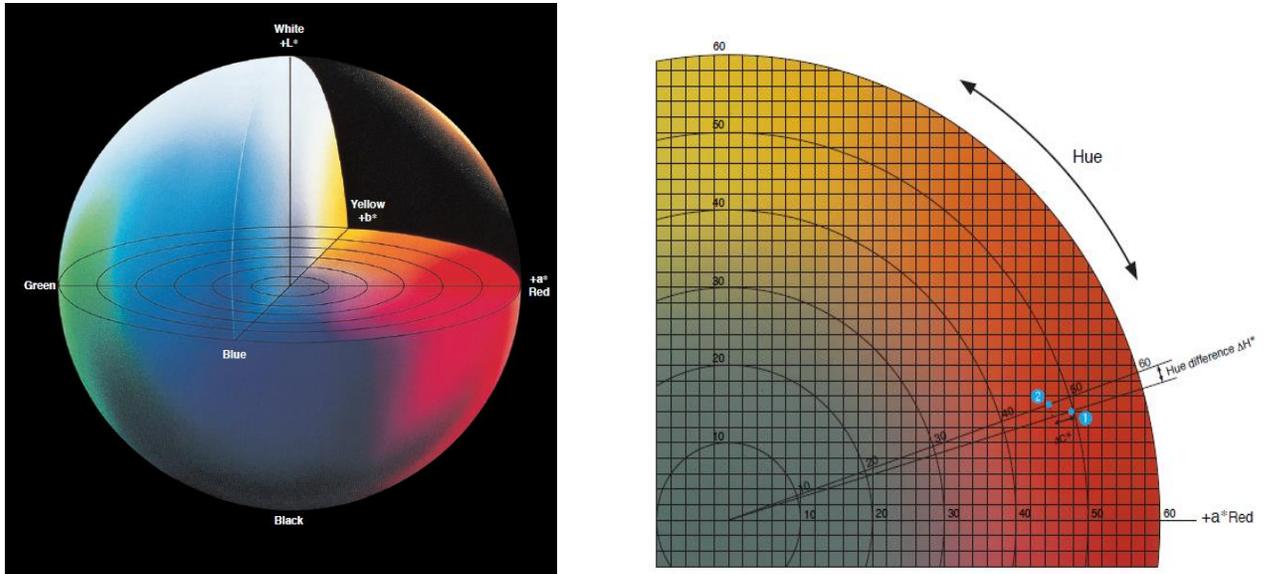


Figura 7. Diagramas de cromaticidad, parámetros L* a* b* (Luminosidad vs Saturación).

Por lo que hace al cálculo de cromaticidad, el Software MSCV no está programado para realizar el cálculo del parámetro C* por lo cual fue necesario obtenerlo con la fórmula que a continuación se describe.

$$(C^*) \text{ Chroma} = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

Se obtuvo la raíz de la suma de los cuadrados de los parámetros a y b donde entre mayor sea el valor de Chroma mayor saturación de color habrá en el sistema.

Como se expuso anteriormente, se suponía que la C4 sería la condición que mayor saturación de color tendría debido a la mayor extracción de polifenoles, no obstante, esto en la Tabla 7 se parecía que fue C7 quien logró mas saturación.

En el parámetro de (a*) todas las condiciones se mueven en los colores verdes (negativos) al rojo (positivos); sin embargo, la C4 se encuentra en un punto medio en comparación con C3 y C7.

En el parámetro de (b*) todas las condiciones se mueven en los colores amarillos; sin embargo, en comparación con C3 y C7, la C4 es la que contiene mayor

concentración de colores amarillos, tal vez debido al comienzo de la polimerización de los polifenoles.

En el parámetro de (L*) recordando que 100 es color transparente con la mayor luminosidad, la C4 con 99.3 es la más cercana a 100.

CONDICIONES	COLOR	CONDICIONES	COLOR	CONDICIONES	COLOR
	a* (rojo-verde)		b* (amarillo-azul)		L* (blanco-negro)
7	-4.39	3	0.58	7	98.1
5	-3.27	1	2.35	1	98.6
6	-3.26	8	2.40	2	98.7
2	-2.30	2	3.27	5	98.7
4	-1.94	7	3.57	6	98.8
3	-1.63	4	3.72	3	99
8	-1.63	6	3.72	4	99.3
1	-0.67	5	3.77	8	99.4

Tabla 6. Análisis de color en el último día de extracción. Cada columna de color enlista de menor a mayor los valores por parámetro de cada una de las 8 diferentes condiciones.

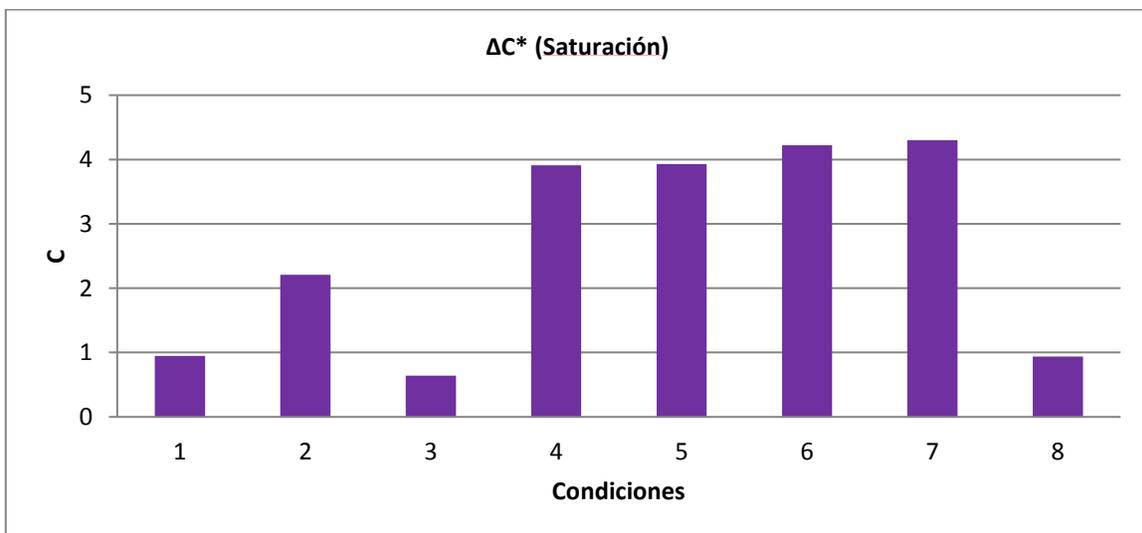
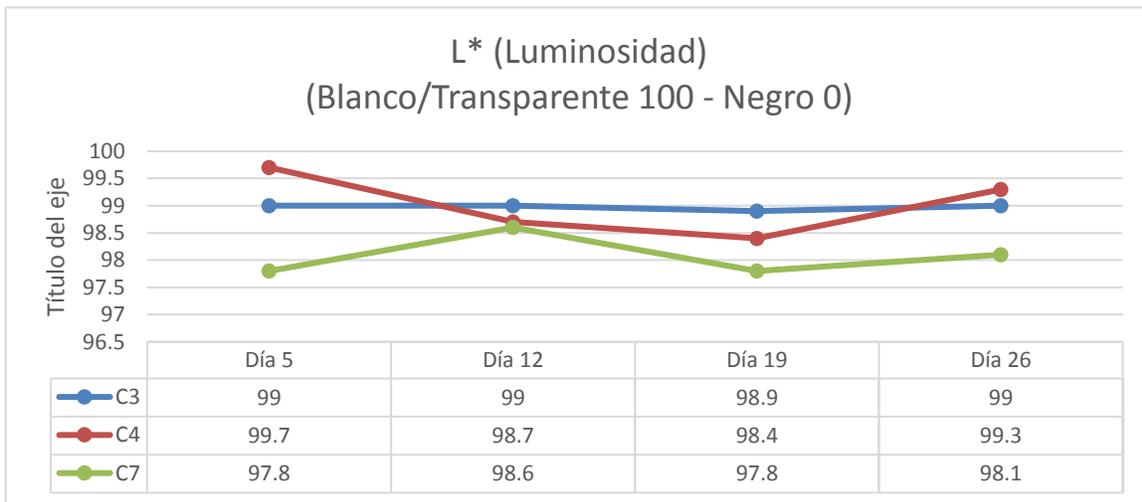
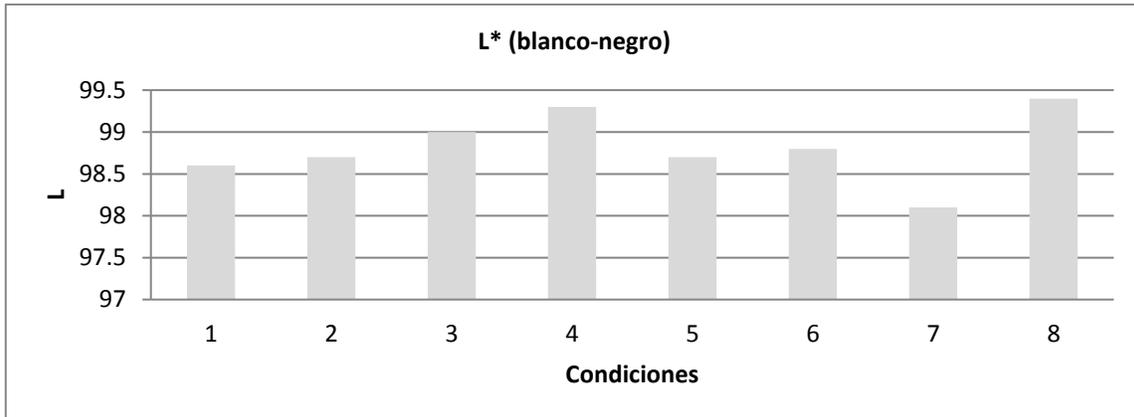
En la Tabla 7 se muestran las diferencias de saturación de color [$\Delta C^* = C^* (\text{SATURACION DIA 26}) - C^* (\text{SATURACION DIA 1})$] en cada una de las condiciones, en donde a mayor cromaticidad mayor color. Observamos que la C3 es la menos saturada y la C7 es la más saturada de color, por lo que la C4 pese a que extrajo mayor concentración de polifenoles, tiene poca influencia en la variabilidad de color en el vino en razón de que los polifenoles presentes no aportan color significativamente, lo que representa una ventaja para la aplicación de esta técnica (Súarez, R., et al, 2007).

CONDICIONES	COLOR
	ΔC^*
3	0.64
8	0.94
1	0.95
2	2.21
4	3.91
5	3.93
6	4.22
7	4.3

Condición	3	4	7
% (v/v) Etanol	10	14	10
(SO ₂) ppm	100	100	100
pH	3	3	3.5
Ác. Tartárico (g/L)	3.0	3.0	3.5
Ác. Málico (g/L)	3.0	3.0	3.5
Chips de madera (g/L)	1	3	3
Vol. Total	100 ml	100 ml	100 ml

Tabla 7. Lado izquierdo, parámetro de diferencia de saturación de color de las 8 diferentes condiciones, enlistándolas de menor a mayor valor. Lado derecho, tabla comparativa de la concentración de los factores de las condiciones C3, C4 y C7 destacando en rojo C4 como la condición más eficaz en extracción de polifenoles.

Las siguientes gráficas ilustran lo antes expuesto:



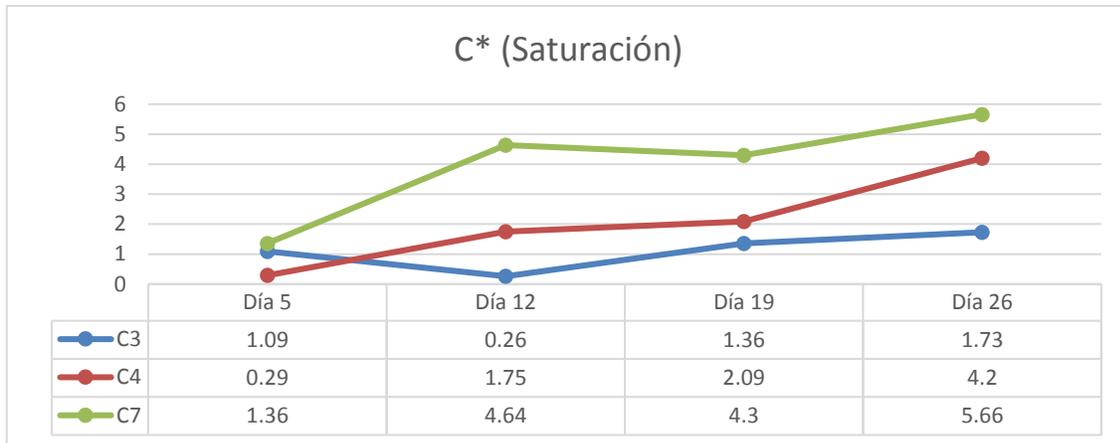


Gráfico 6. Número de botellas vs Luminosidad (L*) y Diferencia de Saturación (Cromaticidad ΔC^*) en la última semana de añejamiento, (día 26). Y movimiento a lo largo de las 4 semanas de los parámetros L* y C* solo de condiciones 3, 4 y 7.

En lo que respecta a la saturación de color, la concentración de los factores en la C4 no favoreció la extracción de color, como si se logró en la C7, lo que se puede explicar por el grado alcohólico y el pH que favorecen la extracción. A mayor pH, mayores cambios de color.



Figura 8. De esta forma lucieron las 8 condiciones de vino modelo al finalizar el proceso de extracción.

A continuación, se muestran en la Tabla 8 las concentraciones y los resultados de fenoles totales y de color de las 3 condiciones en comparación C3, C4 y C7 y dado que el objetivo principal de este proyecto fue extraer la mayor concentración de polifenoles, sin que existan cambios significativos de color o presencia de tonos intensos que modifiquen el vino de forma visual, podemos afirmar a este punto del estudio que el modelo más eficaz fue la C4. Los factores que influyeron directamente sobre los resultados de este proyecto fue el grado de alcohol, pH y cantidad de chips de madera.

Condición	3	* 4	7
% (v/v) Etanol	10	14	10
(SO ₂) ppm	100	100	100
pH	3	3	3.5
Ác. Tartárico (g/L)	3	3	3.5
Ác. Málico (g/L)	3	3	3.5
Chips de madera (g/L)	1	3	3
FT [mg/l]	18.50	27.00	18.00
ΔC*	0.64	3.91	4.30
L*	99.0	99.3	98.1
a*	-2.60	-1.67	-3.13
b*	1.03	3.61	3.07

a* = positivo negativo
 rojo verde
 b* = amarillo azul
 L = blanco (100) negro (0)
 C* = negro(0) blanco (100)

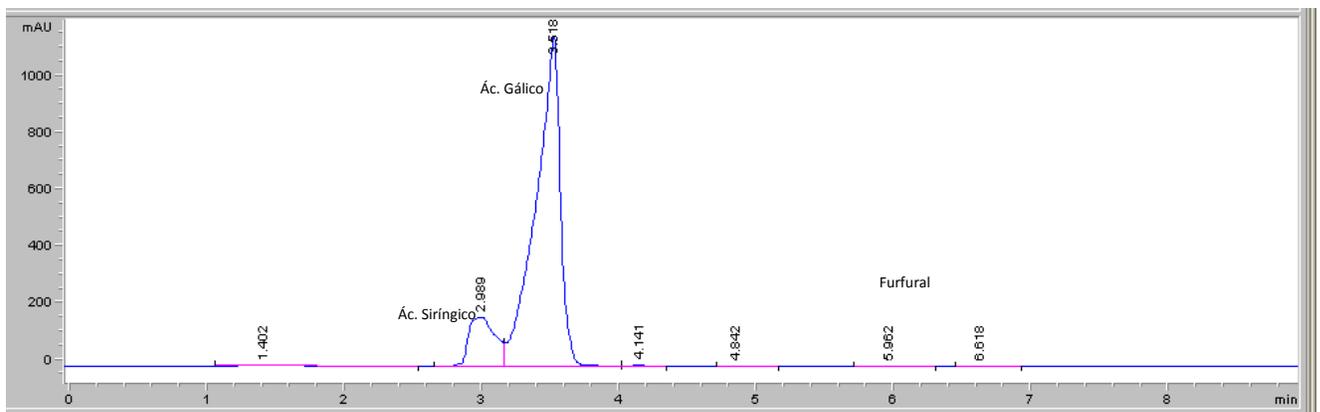
Tabla 8. Condiciones de los componentes básicos de un vino modelo en las condiciones C3, C4 y C7, así como sus resultados de Fenoles Totales y cromaticidad.

3. Separación e identificación parcial de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Al observar que las condiciones C3, C4 y C7 fueron los modelos con mejores resultados, se realizó la separación e identificación parcial de los polifenoles presentes en estas condiciones.

Resultados de la C3:

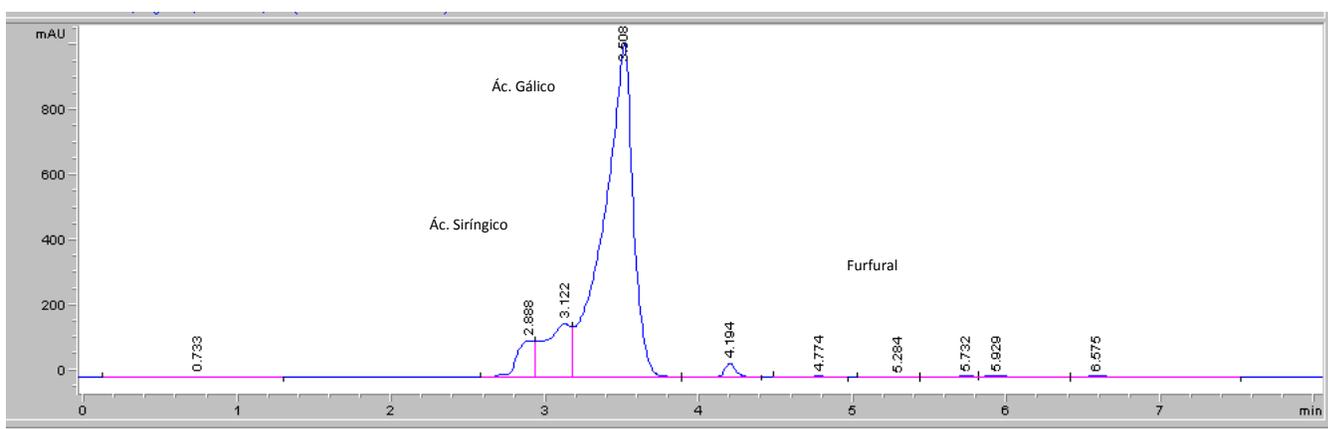
- **Cromatograma de la C3 (condición 3).**



Muestra C3							
#	Tr	Área	Área %	Curva de calibración	R ²	Concentración [mg/L]	Compuesto Fenólico
1	1.402	129.4	0.76	-	-	-	-
2	2.989	2385.6	14.004	13.641 x + 190.56	0.9985	160.9	Ác. Siríngico
3	3.518	14406.7	84.575	11.191 x + 224.51	1	1267.3	Ác. Gálico
4	4.141	53.1	0.312	-	-	-	-
5	4.842	20.9	0.122	-	-	-	-
6	5.962	17.6	0.103	-	-	-	-
7	6.618	21	0.123	8690.1 x + 34275	0.9995	3.95	Furfural

Tabla 9. Características de los 7 compuestos fenólicos separados en la condición 3 y descripción de la curva de calibración utilizada para calcular la concentración de los compuestos fenólicos identificados.

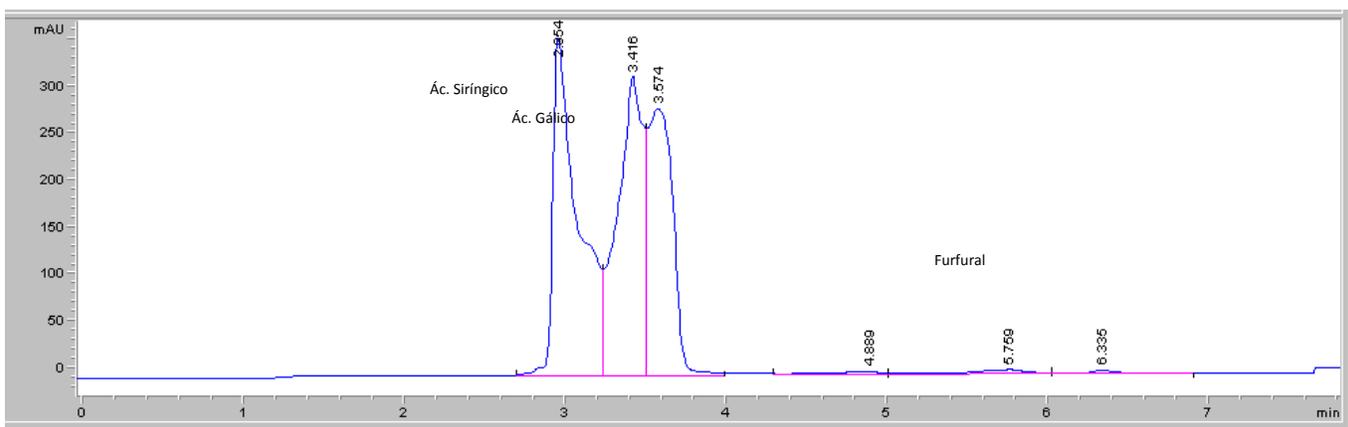
- **Cromatograma de la C4 (condición 4).**



Muestra C4							
#	Tr	Área	Área %	Curva de calibración	R ²	Concentración [mg/L]	Compuesto Fenólico
1	0.733	38.7	0.228	-	-	-	-
2	2.888	940.2	5.549	-	-	-	-
3	3.122	1926.5	11.369	13.641 x + 190.56	0.9985	127.3	Ác. Siríngico
4	3.508	13531.4	79.858	11.191 x + 224.51	1	1189.1	Ác. Gálico
5	4.194	251.8	1.486	-	-	-	-
6	4.774	61.6	0.364	-	-	-	-
7	5.284	12.3	0.073	-	-	-	-
8	5.732	44.2	0.261	-	-	-	-
9	5.929	67	0.396	8690.1 x + 34275	0.9995	3.95	Furfural

Tabla 10. Características de los 9 compuestos fenólicos separados en la condición 4 y descripción de la curva de calibración utilizada para calcular la concentración de los compuestos fenólicos identificados.

- **Cromatograma de la C7 (condición 7).**



Muestra C7							
#	Tr	Área	Área %	Curva de calibración	R ²	Concentración [mg/L]	Compuesto Fenólico
1	2.954	4003.5	36.475	13.641 x + 190.56	0.9985	279.5	Ác. Siríngico
2	3.416	3595	32.754	11.191 x + 224.51	1	301.2	Ác. Gálico
3	3.574	3033.9	27.642	-	-	-	-
4	4.889	116	1.057	-	-	-	-
5	5.759	160.7	1.464	-	-	-	-
6	6.335	66.7	0.608	8690.1 x + 34275	0.9995	3.95	Furfural

Tabla 11. Características de los 6 compuestos fenólicos separados en la condición 7 y descripción de la curva de calibración utilizada para calcular la concentración de los compuestos fenólicos identificados.

Es importante destacar que en las tablas 9, 10 y 11 no fue posible identificar por completo todos los picos que el cromatógrafo HPLC separó, debido a que no se contó en tiempo con los estándares puros o reactivos de los demás posibles compuestos y la identificación se limitó a los estándares en existencia siguientes:

- Ácido Gálico (SIGMA – ALDRICH, product for USA).
- Ácido Siríngico (SIGMA – ALDRICH, product for USA).
- Furfural (SIGMA – ALDRICH, product for USA).

Sin embargo, en la tabla 12 se puede apreciar la comparación de concentraciones de los compuestos cuantificados en cada una de las 3 muestras, con el fin de visualizar con mayor claridad las cantidades cuantificadas que detectan diferencias.

	Concentración [mg/L]		
	C3	C4 *	C7
Ác. Siríngico	160.9	127.3	279.5
Ác. Gálico	1267.3	1189.1	301.2
Furfural	3.95	3.95	3.95

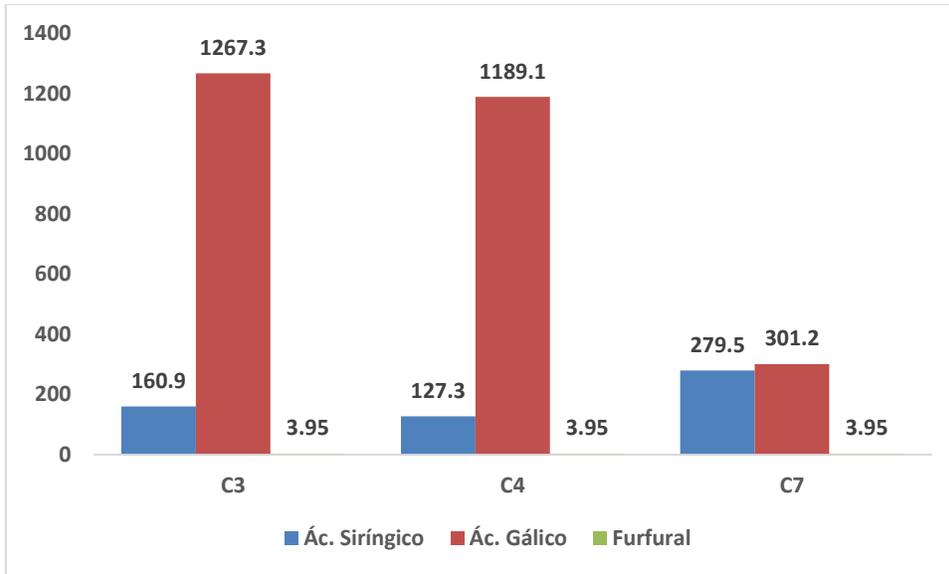
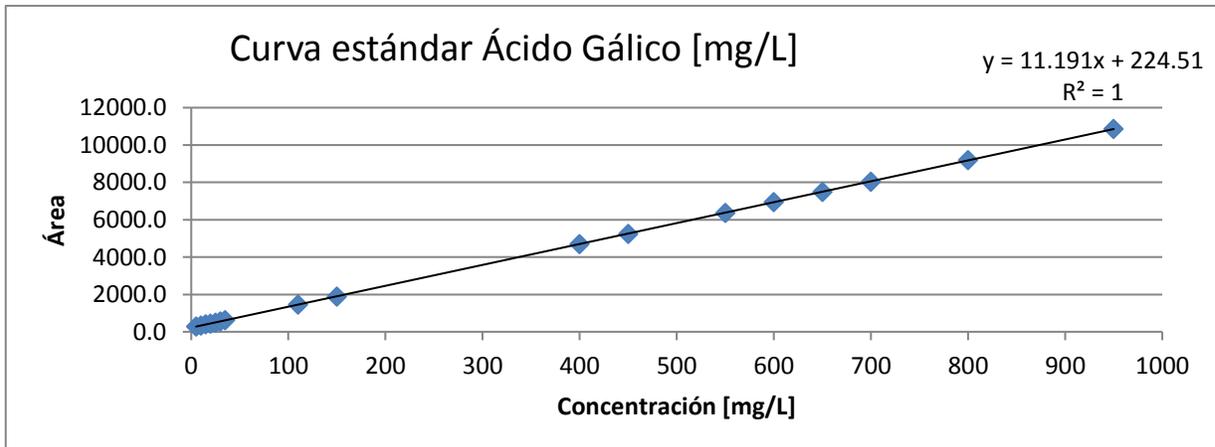


Tabla 12. Comparación de las concentraciones identificadas en las condiciones 3, 4 y 7.

En gráfico 7 se muestra la curva de calibración de cada disolución patrón que se usó para calcular la concentración de los analitos encontrados. El tiempo de retención del pico del analito fue el mismo en todos los cromatogramas; sin embargo fue posible identificar la concentración de cada compuesto fenólico por su área y su curva de calibración:



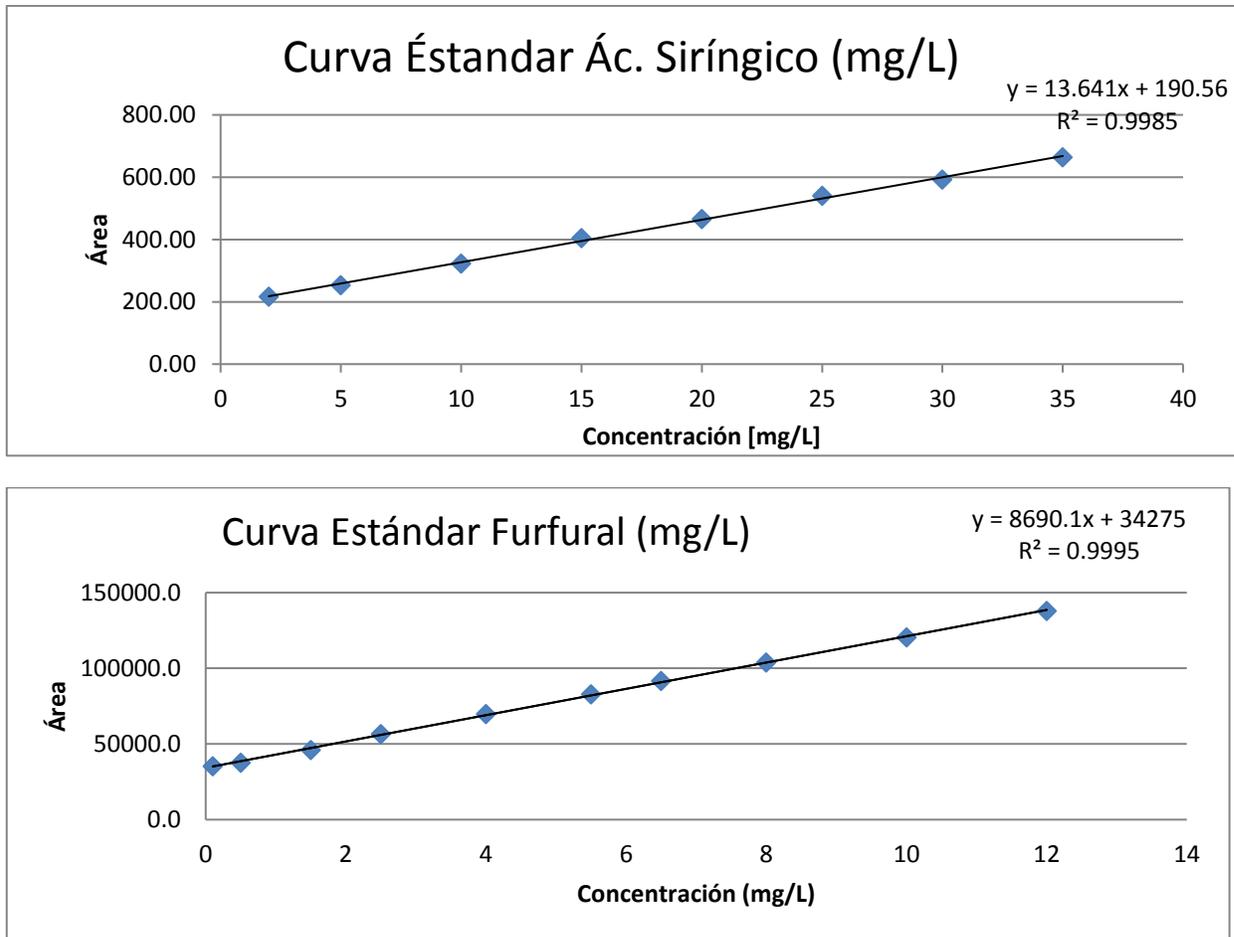


Gráfico 7. Curvas de calibración utilizadas para la identificación de los compuestos presentes en las muestras.

8. Conclusiones

- Se observó que la C4 fue el modelo más eficiente con la extracción de 9 compuestos fenólicos en un proceso de 26 días de añejamiento en un menor tiempo, dinero y espacio. Se obtuvo mayor concentración de polifenoles debido a que en su composición los factores de grado alcohólico, acidez y cantidad de chips de madera influyen de manera positiva en este resultado.
- Se separaron 9 compuestos fenólicos de los cuales se identificaron y cuantificaron con los estándares puros existentes 3 de ellos: ácido siríntrico, ácido gálico y furfural.
- Con un Análisis de Varianza con un $\alpha < 0.05$ se observó una variabilidad de color no significativa con el inicio de reacciones de polimerización y oxidación durante el proceso, considerando que los polifenoles en su mayoría son muy inestables y se transforman rápidamente en varios pigmentos.

- Los chips de madera no afectan la luminosidad de los vinos. En el parámetro de luminosidad (L^*) la condición C4, no mostró diferencia significativa.
- La condición C4 mostró moverse con muy poca intensidad en los colores amarillos esto debido al inicio de la polimerización de los ácidos fenólicos y la influencia de alta concentración de sulfuroso lo que soporta una escasa variación de color en el vino.
- La condición C7 en cuanto a la cromaticidad (ΔC^*) fue la más alta y coincide con el mayor valor de pH de 3.5 debido a que a mayor pH, mayor variabilidad de color.
- En conclusión es viable la extracción eficiente de más compuestos fenólicos sin grandes cambios en la cromaticidad de los vinos modelo, permitiendo que se puedan añejar los vinos blancos, rosados o tintos con chips de madera de roble sin alteración sustantiva de color.

9. Referencias

- Arapitsas, P., Antonopoulos, A., Stefanou, E., Dourtoglou, V.G. (2004). *Artificial aging of wines using oak chips*. Food Chemistry Volumen 86, páginas 563-570.
- Espitia López Josefa. 2015. *“Estudio fisicoquímico y sensorial de un vino tinto Mexicano, variedad Merlot, añejado en bodega vs chips de madera de roble”*. (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma Metropolitana. Ciudad de México.
- Hernández Carpiá Miguel Ángel. 2016. *“Estudio de la composición volátil y perfil sensorial de un vino rosado elaborado con uvas Cabernet Sauvignon, madurado en botella con la adición de chips de madera”*. (Tesis Maestría). Universidad Autónoma Metropolitana. Ciudad de México.
- Konica Minolta Sensing, INC., *Precise color communication*. Color control from perception to instrumentation. Japan. 2007.
- M. A. Amerine, Cornelius S. Ough. (1976). *Análisis de vinos y mostos*. Editorial Acribia, Zaragoza, - Science - 158 páginas.
- M.A.Gómez Gallego ^a, E. Gómez García-Carpintero, ^aE. Sánchez-Palomo ^aM.A.González Viñas ^aI. Hermosín-Gutiérrez ^b. (2013). *Evolución del contenido fenólico, características cromáticas y propiedades sensoriales durante el almacenamiento en botella de vinos tintos de un solo cultivo de la región de Castilla La Mancha*. Food Research International, volumen 51, número 2, páginas 554 – 563.
- Ortiz Hernández Adriana. 2019. *Evaluación de las potencial redox, características fisicoquímicas y enzimas oxidantes durante el añejamiento en botella con chips y barricas de roble blanco americano del vino blanco Sauvignon blanc y vino modelo*. Tesis de Doctorado en proceso. Universidad Autónoma Metropolitana.

- Puech J. L., Feuillat F., Mosedale J. R. Am J Enol Vitic. January. (1999). *Los Taninos de la madera de roble: estructura, propiedades y su influencia en el sabor del vino*. American Journal of Enology and Viticulture. Volumen 50, páginas 469 – 478.
- Rivera M.S. (2005). *Evolución de la composición fenólica y perfil organoléptico de vinos Cabernet Sauvignon y Malbec durante su crianza en barricas de roble francés y americano*. Universidad Nacional de Cuyo, Argentina.
- S. Martínez-Flórez, J. González-Gallego, J. M. Culebras y M. J. Tuñón. (2002). *Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes*. Departamento de Fisiología, Universidad de León y Hospital de León. España. Volumen XVII, número 6, páginas 271-278.
- Sanz M., Cadahía E, Esteruelas E, Muñoz AM, Fernández de Simón B, Hernández T, Estrella I. (2010). *Compuestos fenólicos en duramen de cereza (Prunus avium) con miras a su uso en tonelería*. J Agric Food Chem. Volumen 58, páginas 4907-14.
- Suárez, R., Monagas, M., Bartolomé, B., y Gómez – Cordovés, C. (2007). *Phenolic Composition and Colour of Vitis Vinifera L. cv Merlot Wines from Different Vintages and Aging time in bottle*. Ciencia Téc. Vitiv. Volumen 22, número 2, páginas 35-44.
- Towey J. P., Waterhouse A. L. Am J. January. (1996). *Análisis de componentes volátiles de madera de roble por extracción con solventes y desorción térmica directa – cromatográfica de gases – espectrometría de masas*. Volumen 47, páginas 17 – 20.
- Vernon L. Singleton, Rudolf Orthofer, Rosa M.Lamuela-Raventós. (1999). *Análisis de fenoles totales y otros sustratos de oxidación y antioxidantes por medio del reactivo folin-ciocalteu*. Science Direct. Volumen 299, páginas 152 – 178.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00202

Matricula: 2173801522

EXTRACCION Y DETERMINACION DE COMPUESTOS FENOLICOS EN UN VINO MODELO ADICIONADO CON CHIPS DE MADERA DE ROBLE.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 18 del mes de noviembre del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JOSE RAMON VERDE CALVO
DR. HECTOR BERNARDO ESCALONA BUENDIA

siendo el primero asesor de la alumna y lector el segundo, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA

DE: DANIELA MORENO MENA

y de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, se comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



DANIELA MORENO MENA
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

ASESOR

DR. JOSE RAMON VERDE CALVO

LECTOR

DR. HECTOR BERNARDO ESCALONA
BUENDIA