



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

**CLASIFICACIÓN DE VINOS CON BASE EN SU CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE Y SU PERFIL DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR
DE PROTÓN**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADA EN QUÍMICA

PRESENTA:

ARLENE SOTO HERNÁNDEZ

DIRECTORES DE TESIS:

**DR. JOSÉ ANTONIO RODRÍGUEZ ÁVILA
M. EN C. ARACELI SIERRA ZENTENO**

PACHUCA DE SOTO, HGO.

MARZO DE 2009



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
LICENCIATURA EN QUÍMICA

M. en C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO,
DIRECTOR DE CONTROL ESCOLAR
DE LA U.A.E.H.,
Presente:

Por este conducto le comunico que el Jurado asignado a la pasante de Licenciatura en Química **Arlene Soto Hernández** quien presenta el trabajo de titulación "Clasificación de vinos con base en su capacidad antioxidante y su perfil de resonancia magnética nuclear de protón" después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE: M. en C. Araceli Sierra Zenteno

PRIMER VOCAL: Dr. José Antonio Rodríguez Ávila

SEGUNDO VOCAL: Dra. María Elena Páez Hernández

TERCER VOCAL: Dra. Alicia del Carmen Mondragón Portocarrero

SECRETARIO: Dr. Carlos Andrés Galán Vidal

PRIMER SUPLENTE: M. en C. Benito Flores Chávez

SEGUNDO SUPLENTE: Dra. Elizabeth Contreras López

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE HIDALGO

ATENTAMENTE

"Amor, Orden y Progreso"

Mineral de la Reforma, Hidalgo a 25 de febrero de 2009.

PA

Dra. Claudia Coronel Olivares
Coordinadora Adjunta de la Lic. en Química



CENTRO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICAS

Ciudad Universitaria Carretera Pachuca – Tulancingo Km. 4.5 C.P. 42076
Col. Carboneras. Mineral de la Reforma, Hidalgo.
Tel. 017717172000 Ext. 2218 Fax ext. 6502
ccoronel@uaeh.reduaeh.mx



Este trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Química Analítica y Electroquímica del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

La investigación se realizó gracias al financiamiento del proyecto CONACYT CB-2006-61310 *“Diseño y validación de sistemas automatizados de separación magnética en flujo”*

Se agradece a la Dirección de Intercambio Académico (DIA) y al Fideicomiso de Movilidad Estudiantil de la UAEH por el apoyo económico otorgado para la estancia académica realizada en la Universidad de la Rioja, España durante el semestre Enero-Junio 2008.

Parte de este trabajo ha sido presentado en:

XXII Congreso Nacional de Química Analítica (2008), con el trabajo:

“Determinación de la capacidad antioxidante de vinos mediante análisis de inyección en flujo con detección amperométrica”.

*La utopía está en el horizonte. Me acerco dos pasos,
ella se aleja dos pasos. Camino diez pasos
y el horizonte se corre diez más allá.
¿Para qué sirve la utopía? Para eso sirve: para caminar.*

Eduardo Galeano

AGRADECIMIENTOS

Al momento de finalizar un trabajo, es casi imposible sentir que ha sido sólo el producto de tu esfuerzo, pero basta un instante para darte cuenta de que en realidad, es la suma de pequeñas y grandes aportaciones de quienes en su momento te facilitaron su valiosa ayuda. A todas esas personas quisiera agradecerles; a los que llegara a omitir de antemano mil disculpas.

En primer lugar, a Pepe, quien puso su dedicación y paciencia, bueno a veces no mucha, en la realización de esta tesis. Agradezco infinitamente que haya tomado parte de su tiempo para guiarme en el camino de esta investigación, sobre todo porque aun cuando no era su obligación, le dedicó sus fines de semana. Gracias también, por todo el apoyo antes y durante mi estancia, sin duda alguna ese viaje no hubiera sido posible sin sus sabios consejos.

En segundo lugar, pero no menos importante, a la M. en C. Araceli Sierra Zenteno por su invaluable apoyo y asesoría durante la elaboración de esta tesis, le debo la clarificación de mis desordenadas ideas. De forma muy especial quisiera agradecerle por su orientación en mis estudios de licenciatura y su constante atención durante mi estancia.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Claudia Coronel Olivares, por la ayuda brindada para la solicitud y renovación de becas, principalmente porque siempre tuvo la mejor disponibilidad para resolver los problemas que se presentaron en cada uno de los trámites.

Agradezco a mi tutora la Dra. Elena Ma. Otazo Sánchez, quien siempre tuvo para mí palabras de aliento.

De manera especial agradezco al Dr. Fidel Pérez Moreno, por su comprensión y apoyo durante mi servicio social, y por transmitirme una pequeña parte de sus conocimientos.

A la Dra. Eva Ma. Santos López, por permitirme, de forma desinteresada, usar su equipo para mis experimentos.

Al M. en C. Benito Flores Chávez, por la realización de los experimentos de resonancia y por sus valiosas observaciones que sin duda alguna mejoraron este trabajo.

Mi agradecimiento para los sinodales que amablemente leyeron este trabajo y emitieron sus comentarios profesionales: Dra. Ma. Elena Páez Hernández, Dr. Carlos Andrés Galán Vidal, Dra. Alicia del Carmen Mondragón Portocarrero y Dra. Elizabeth Contreras López.

Debo agradecer de manera especial a la coordinadora de la Licenciatura en Química de la Universidad de la Rioja, Dra. Elena Lalinde Peña, por su apoyo durante mi estancia; asimismo, a los profesores Dr. Pedro J. Campos Guerra, Dra. Cecilia Sáenz Barrio y Dr. Jesús R. Berenguer Marín, por su tiempo de asesoría y por facilitar la comprensión de sus complicadas asignaturas.

Al Grupo de Síntesis Química de la Rioja, en especial a los Drs. Jesús H. Busto Sancirán y Jesús M. Peregrina García, por aceptarme dentro de su grupo de trabajo. A la estudiante de doctorado Eva López Rituerto, por compartir sus conocimientos y el gusto por el estudio de los vinos.

Por hacer un ambiente de trabajo divertido y solidario agradezco a mis compañeros del laboratorio de Analítica: Irma, Yu, Tere, Chivis, Israel, Pris, Gaby, Karina,

Charly y Campanita. Un especial agradecimiento a la ahora Dra. Araceli Castañeda Ovando por su ayuda en la realización de este trabajo y por sus sugerencias en los congresos.

A mis amigos en la carrera Etza, Araceli, Karina, Erika y Mac, gracias por todas las aventuras compartidas y por hacerme reír aún en los momentos más difíciles.

Por ser los mejores y siempre darme una y mil razones para seguir adelante, a mis amigos de toda la vida Bere y Gama.

A mi familia, por ser mi familia, y por hacerme una persona fuerte y tolerante.

Porque sin su ayuda, sus consejos y su atención esta tesis no hubiera sido posible, a mi abuelita Cata.

A mi tío Osvaldo, por ser mi guía y por todo el “viboreo” de sobremesa, para ti mi más profundo agradecimiento.

A mí mamá, por exigir lo posible y hasta lo imposible, y por enseñarme que la vida es una serie de “ires” y “venires”, lo importante es avanzar.

A mi Isra, por quererme y por compartir todo este tiempo como mi mejor aliado, jugando siempre de mi lado. Gracias por estar conmigo aun cuando estaba al otro lado del mundo.

ÍNDICE

Abreviaturas, siglas y símbolos	<i>i</i>
Índice de Figuras	<i>ii</i>
Índice de Tablas	<i>iii</i>

RESUMEN

1. ANTECEDENTES	1
1.1. El vino	2
1.1.1. Etapas de producción del vino	3
1.1.2. Compuestos orgánicos presentes en la uva y el vino	5
1.1.2.1. Azúcares	5
1.1.2.2. Ácidos orgánicos	6
1.1.2.3. Compuestos nitrogenados	8
1.1.2.4. Antioxidantes	9
1.2. Técnicas de caracterización de vinos	12
1.2.1. Capacidad antioxidante	13
1.2.2. Técnicas cromatográficas	15
1.2.3. Espectroscopia infrarroja	16
1.2.4. Resonancia magnética nuclear	16
1.3. Análisis por inyección en flujo	17
1.4. Análisis de componentes principales	20
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo general	24
2.2. Objetivos específicos	24
3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	25
3.1. Muestras	26
3.2. Disoluciones	27
3.3. Equipo	27

3.4. Análisis de muestras	28
3.4.1. Determinación de la capacidad antioxidante de vinos	28
3.4.1.1. Metodología FIA	28
3.4.1.2. Metodología de referencia	29
3.4.2. Clasificación de vinos con base en su perfil de ¹ H-RMN	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1. Determinación de la capacidad antioxidante en vinos	32
4.1.1. Optimización de las variables electroquímicas	32
4.1.2. Optimización de las variables del sistema FIA	33
4.1.3. Parámetros analíticos	38
4.1.4. Comparación con la metodología de referencia	40
4.1.5. Análisis de muestras	41
4.2. Clasificación de vinos con base en su perfil de ¹ H-RMN	42
4.2.1. Análisis de los espectros de ¹ H-RMN de vinos	42
4.2.2. Análisis de componentes principales	46
5. CONCLUSIONES	51
6. REFERENCIAS	54

ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS

AAT	Actividad antioxidante total
AC	Análisis clúster
ACP	Análisis de componentes principales
ANOVA	Análisis de varianza
CAET	Capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox
cm	Centímetro
CP	Componente principal
DER	Desviación estándar relativa
FIA	Análisis por inyección en flujo
g	Gramo
h	Hora
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
Kg	Kilogramo
l	Litro
μA	Microamperio
μl	Microlitro
mg	Miligramo
MLF	Fermentación malo-láctica
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Segundo
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
Uv-Vis	Ultravioleta visible
V	Voltio

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Tecnología básica de vinificación.	3
Figura 2.	ACP para dos variables originales y siete objetos.	22
Figura 3.	Esquema del montaje FIA utilizado en la determinación de la capacidad antioxidante de vinos.	29
Figura 4.	Evolución experimental del volumen de inyección y la longitud del reactor durante la optimización mediante SIMPLEX súper modificado.	37
Figura 5.	Evolución de la altura de la señal analítica durante los experimentos realizados en la optimización utilizando el método SIMPLEX súper modificado.	38
Figura 6.	FIagrama de disoluciones patrón de Trolox y muestras de vino.	39
Figura 7.	Espectro típico de 1H-RMN para vino.	44
Figura 8.	Ampliación de un espectro típico de 1H-RMN para vino entre 0.60 y 3.00 ppm.	45
Figura 9.	Gráfico de sedimentación de las componentes principales formadas.	46
Figura 10.	Gráficos de eigenvectores para la primera (CP_1) y segunda componente principal (CP_2).	47
Figura 11.	Gráficos de escores, CP_1 versus CP_2 , de los diferentes intervalos de desplazamientos químicos analizados.	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Sólidos solubles totales, glucosa, fructosa y relación glucosa/fructosa de distintas variedades de uva de la especie <i>Vitis labrusca</i> .	6
Tabla 2.	Acidez total titulable, pH, tartratos totales, malatos totales y relación tartrato/malato de distintas variedades de vino.	7
Tabla 3.	Contenido de aminoácidos en uva de la especie <i>Vitis vinífera</i> .	8
Tabla 4.	Relación entre el contenido de aminoácidos en el vino y la cantidad de fertilizante utilizado en la producción de la uva.	9
Tabla 5.	Contenido total de compuestos fenólicos en uva roja y verde.	11
Tabla 6.	Valores típicos de concentración de compuestos fenólicos en vinos blancos y tintos.	12
Tabla 7.	Matriz X de p variables originales para i objetos.	21
Tabla 8.	Principales características de las muestras de vino analizadas.	26
Tabla 9.	Sensibilidad analítica de la línea de calibrado en función del pH.	32
Tabla 10.	Sensibilidad analítica de la línea de calibrado en función del potencial de trabajo.	33
Tabla 11.	Niveles de los factores a optimizar.	34
Tabla 12.	Combinación de niveles y resultados obtenidos.	34
Tabla 13.	Factores F y valores p obtenidos en el diseño factorial.	35
Tabla 14.	Parámetros de regresión de las líneas de calibrado, intensidad (μA) vs concentración ($\text{mg}_{\text{Trolox}} \text{ l}^{-1}$).	39
Tabla 15.	CAET en muestras de vino determinada por el método de flujo propuesto y por valoraciones UV-Vis.	40
Tabla 16.	CAET determinada en muestras de vinos de diferentes denominaciones de origen por el método de análisis propuesto.	41
Tabla 17.	ANOVA de una vía de los grupos de muestras de vino de diferente tipo y origen analizados.	42

RESUMEN

El vino contiene cientos de compuestos orgánicos e inorgánicos en intervalos de concentración amplios; el tipo y concentración de estos compuestos dependen de diversos factores como el origen geográfico, el tipo de cultivo, las condiciones climáticas, el uso de fertilizantes, y finalmente, de las técnicas de vinificación empleadas para su elaboración.

La composición química de los vinos y sus propiedades organolépticas están estrechamente relacionadas y reflejan de forma evidente la calidad y características propias de cada uno, es por esta razón que su análisis químico ha cobrado importancia en las últimas décadas.

Las técnicas de caracterización de los vinos son diversas y combinan el análisis instrumental (resonancia magnética nuclear, espectroscopía infrarroja, cromatografía de gases y líquidos, colorimetría, amperometría, etc.) con el quimiométrico (análisis de componentes principales, análisis clúster, método del K-entorno más próximo, etc.). El objetivo de estas técnicas es clasificar a los vinos de acuerdo a su contenido de antioxidantes, aminoácidos, aminas biogénicas, etanol, azúcares y ácidos orgánicos.

En el presente trabajo se plantean dos estrategias para la clasificación de vinos. La primera se basa en la determinación de su capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox (CAET) mediante análisis por inyección en flujo (FIA) con detección amperométrica, obteniendo diferencias significativas entre los resultados correspondientes a vinos tintos y blancos. La segunda utiliza el análisis de componentes principales (ACP) de los espectros de resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H-RMN}$) obtenidos para las muestras de vino, y logra agrupar dichas muestras en tres clasificaciones diferentes de acuerdo a su tipo y origen.



CAPÍTULO 1
ANTECEDENTES

1. ANTECEDENTES

1.1. El vino

El término vino se refiere a una bebida alcohólica de origen natural producida a partir de la fermentación de uvas maduras, en estricta concordancia con las regulaciones vigentes para cada país [1].

El origen del vino es muy antiguo, se afirma que hace más de 7,000 años los primeros pueblos nómadas elaboraron vino a partir de uvas silvestres; cuando estos pueblos se volvieron sedentarios, la vid fue, junto con el olivo y la higuera, una de las primeras plantas aprovechadas y cultivadas por el hombre. Los primeros testimonios del cultivo de la vid se remontan al año 7,000 a.C. en el legendario país de Sumer, al sur del Mar Negro [2,3].

En el año 4,000 a.C., la difusión del vino alcanzó Mesopotamia, Asiria y Egipto. En este último, el comercio del vino tuvo su primer período de prosperidad; se asegura que grandes naves y caravanas lo transportaban desde el río Nilo hasta los principales centros de comercio del Mediterráneo [2].

La Grecia arcaica fue el escenario de la siguiente etapa de resplandor del vino. Se cree que los minoicos de Creta, quienes mantenían fuertes lazos económicos con Egipto, sirvieron de puente entre las culturas de Grecia y Egipto. En la segunda mitad del segundo milenio a.C., Roma y Grecia otorgaron al vino una gran importancia social y religiosa, y fueron precisamente estas dos culturas las que difundieron su producción a toda Europa [2-4].

En la actualidad, el consumo del vino se ha generalizado en casi todo el mundo, y el consumidor se ha vuelto más exigente y sofisticado, lo que ha obligado a la industria vinícola a mejorar los procesos de producción y a interesarse por el estudio químico de vino con el objeto de ofrecer una bebida con cierta estabilidad, producida a partir de materias primas selectas, bajo estrictas condiciones de higiene y calidad [4].

1.1.1. Etapas de producción del vino

El proceso de vinificación implica una serie de pasos (Figura1) que comienzan con la selección de la materia prima, las uvas, y terminan con el embotellado [5].

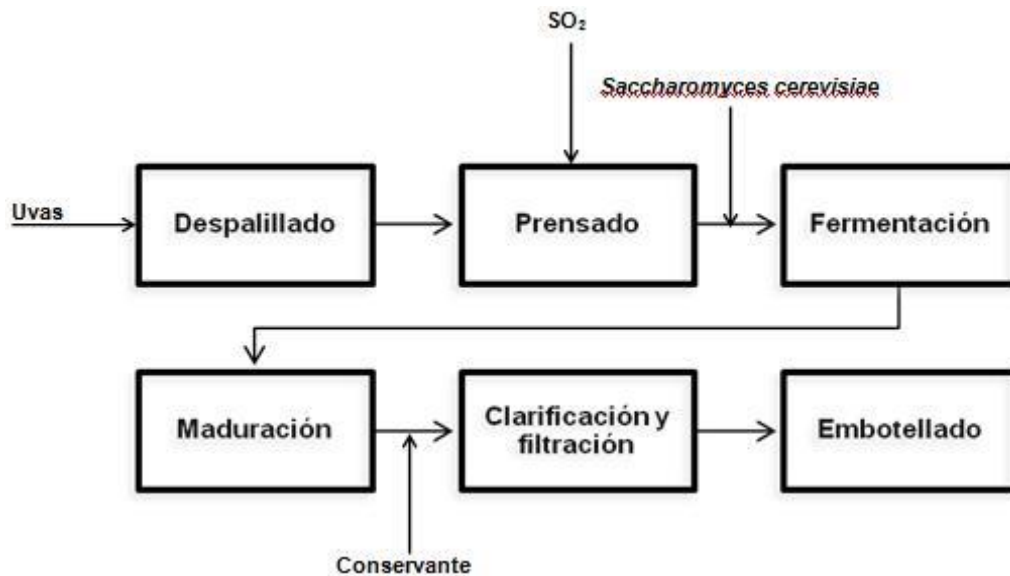


Figura 1. Tecnología básica de vinificación.

El primer paso en la elaboración del vino, después de la recolección de la uva, es el despalillado, en esta etapa se retiran los tallos, hojas y peciolo de las bayas, las cuales pasan a la segunda etapa, el prensado.

El objetivo del prensado es obtener el mayor rendimiento posible de mosto (jugo de uva), este porcentaje depende del tipo de maquinaria utilizada, ya sea una prensa de husillo, de cinta continua o de tanque; a menudo se añaden enzimas pectinolíticas que facilitan el proceso [6]. La adición de SO_2 es una práctica habitual que tiene como finalidad inhibir el crecimiento de levaduras incontroladas y de bacterias alteradoras, que causan problemas durante la fermentación [7-10].

El color del vino está determinado por el color de la uva, sin embargo un factor importante es el tiempo de contacto entre el mosto obtenido y el hollejo (piel del fruto), durante la etapa anterior [1,6].

La maceración carbónica es un método alternativo al prensado, consiste en mantener las uvas intactas durante algunos días en una atmósfera de alto contenido de CO₂, ocasionando la muerte celular y la pérdida de la semi-permeabilidad de las paredes celulares seguida de reacciones enzimáticas que incluyen la producción de etanol. La maceración carbónica se utiliza regularmente en vinos tintos, debido a que las condiciones ácidas y alcohólicas características de este proceso favorecen la extracción de antocianinas contenidas en el hollejo. Las ventajas que representa este tipo de maceración son una maduración rápida, un sabor “suave” y un alto contenido de compuestos fenólicos antioxidantes en el producto final [6,11].

El siguiente paso en la producción del vino, es la fermentación alcohólica, que implica la conversión de azúcares a etanol, llevada a cabo por una gran diversidad de levaduras [8]. La microflora presente en el mosto depende, en la mayoría de los casos, de la ubicación geográfica; sin embargo en casi todos los procesos fermentativos suele agregarse *Saccharomyces cerevisiae*, ya que esta levadura posee las mejores características para la elaboración del vino [6].

Seguida a la fermentación alcohólica ocurre la fermentación maloláctica (MLF), que consiste en la formación de ácido láctico a partir de la descarboxilación del ácido málico [8]. La principal consecuencia de la MLF es la desacidificación, debido a que el ácido láctico es más débil que el málico. La proporción de los ácidos láctico, málico y tartárico en el vino depende del grado de desacidificación [6]. Según el tipo de vino elaborado, la MLF se considera deseable o no, por ejemplo: la desacidificación es importante en la producción de vinos tintos de alta acidez, pero no lo es para los vinos californianos de baja acidez [2,4].

La maduración del vino tiene lugar en barriles y toneles de madera, preferentemente de roble. El tiempo de maduración varía considerablemente, los vinos jóvenes suelen necesitar sólo 6 meses, sin embargo los vinos reserva y gran reserva generalmente necesitan más tiempo [7].

Los procesos de filtración a los que se somete el vino van desde una filtración grosera hasta tratamientos totalmente esterilizantes, y en la mayoría de los casos representan una pérdida de aroma. La clarificación del vino se logra con la adición de bentonita, un agente clarificante que sedimenta las proteínas causantes de turbidez [9].

Con el fin de brindar al vino cierta estabilidad, antes del embotellado, se agregan sustancias antimicrobianas como SO₂ o ácido sórbico. Finalmente, el vino se embotella bajo una atmósfera inerte, regularmente en botellas de vidrio aunque existen en el mercado vinos en botellas de plástico o *tetra-pack* [6].

1.1.2. Compuestos orgánicos presentes en la uva y el vino

Existen cientos de compuestos orgánicos en la uva. Éstos ya sea iguales en estructura o con ligeras modificaciones, como consecuencia de los procesos fermentativos, se encuentran en el vino en diferentes concentraciones [6].

Los niveles de concentración de compuestos orgánicos en el vino dependen de las técnicas de vinificación empleadas para su elaboración y en gran parte del tipo de uva a partir de la cual se elaboró. La especie europea *Vitis vinifera* domina el mercado de producción de vino, sin embargo existen otro tipo de especies, norteamericanas en su mayoría, cuyos híbridos son utilizados en menor cantidad para la fabricación de vinos, entre estas especies se encuentran *Vitis labrusca*, *Vitis aestivalis*, *Vitis riparia* y *Vitis rotundifolia* [1,2,5,7].

A continuación se describe a detalle los principales compuestos orgánicos presentes en la uva y el vino, así como su origen e importancia. Los valores reportados son específicos para cada especie y variedad.

1.1.2.1. Azúcares

Los azúcares que han sido identificados en frutos de la especie *Vitis vinifera* son las siguientes: estaquiosa, maninotriosa, rafinosa, melibiosa, maltosa, sacarosa, galactosa, glucosa y fructosa. La glucosa y la fructosa son los azúcares de mayor interés, pues reflejan la madurez de las uvas. El azúcar predominante en los frutos inmaduros es la glucosa, la relación glucosa/fructosa es cerca de 1.00 cuando el fruto madura [2,5].

El contenido de azúcares es fundamentalmente importante, ya que a partir de estos compuestos se obtiene el componente esencial del vino, el alcohol etílico, el cual ha sido útil durante las últimas décadas para clasificar, tasar y evaluar los vinos [6].

El máximo rendimiento teórico de la producción de alcohol a partir de una hexosa, es 51.1%; sin embargo en la práctica el porcentaje obtenido es menor debido a la influencia de diversos factores como la variedad de la uva, el tipo de azúcares presentes, las condiciones ambientales de temperatura y presión, y la microflora existente durante la fermentación alcohólica [8].

La Tabla 1 muestra el contenido de glucosa y fructosa, y la relación glucosa/fructosa en distintas variedades de uva, se puede observar que la relación glucosa/fructosa es cerca de 1.00 lo que indica una cierta madurez [5].

Tabla 1. Sólidos solubles totales, glucosa, fructosa y relación glucosa/fructosa de distintas variedades de uva de la especie *Vitis labrusca* [5].

Variedad	Sólidos solubles totales ^a	α -D-glucosa ^b	β -D-glucosa ^b	D-fructosa ^b	Relación glucosa/fructosa
Delaware	19.7	4.00	4.50	10.60	0.90
Catawba	16.9	2.75	3.80	7.70	0.85
Aurora	15.8	3.00	3.85	7.75	0.88
Villard blanc	13.6	2.50	3.10	6.80	0.82
Chancellor	15.9	2.60	3.35	6.40	0.93
De Chaunac	18.3	3.70	5.00	9.00	0.97

^aBrix: Unidades comúnmente utilizadas para medir la densidad de mostos y vinos; estas unidades reflejan el tanto por ciento en peso de sacarosa en soluciones sacarosa-agua.

^b g/100ml

1.1.2.2. Ácidos orgánicos

Aunque las cantidades de estos compuestos son bajas en los vinos (acidez titulable total < 1.20 g ácido tartárico/100 ml), los ácidos orgánicos son constituyentes importantes que afectan tanto el proceso de elaboración del vino como las propiedades organolépticas y la estabilidad de la bebida final [5].

La presencia de los ácidos cítrico, málico y tartárico es decisiva durante la elaboración del vino debido a que los pares ácido-base correspondientes a dichos ácidos, amortiguan el pH entre 3.00 y 4.00 proporcionando las condiciones propias para la fermentación, protegiendo al vino del crecimiento de bacterias que puedan alterar su calidad [8].

El ácido tartárico y el ácido málico, suelen determinar el pH final del vino, el cual no debe superar 3.40, pues la probabilidad de que su calidad se vea afectada por acción bacteriana aumenta considerablemente [9,12]. La Tabla 2 muestra la concentración de ácido málico y tartárico en vinos de distintas variedades de uva, nótese que los valores de pH en ningún caso son mayores a 3.40 [5].

Tabla 2. Acidez total titulable, pH, tartratos totales, malatos totales y relación tartrato/malato de distintas variedades de vino [5].

Variedad	Cosecha	Acidez titulable total ^a	pH	Tartratos totales ^a	Malatos totales ^b	Relación tartrato/malato
Concord	1971	0.80	3.37	0.57	0.41	1.39
	1972	0.64	3.38	0.37	0.21	1.76
Catawba	1971	0.94	3.08	0.65	0.48	1.35
	1972	0.85	3.16	0.43	0.33	1.30
Chancellor	1971	0.99	3.26	0.67	0.69	0.97
	1972	0.81	3.16	0.66	0.34	1.94
DeChaunac	1971	1.19	3.06	0.71	0.84	0.85
	1972	0.86	3.20	0.53	0.37	1.43
Vidal 256	1971	1.02	3.06	0.74	0.30	2.47
	1972	0.92	3.08	0.63	0.37	1.70
Villard blanc	1971	1.03	2.93	0.79	0.30	2.63
	1972	0.99	3.08	0.63	0.27	2.33

^a g ácido tartárico/100 ml

^b g ácido málico/100 ml

El ácido acético es otro compuesto orgánico que tiene una gran influencia sobre la calidad de un vino. La presencia de este ácido es resultado de la oxidación del etanol por bacterias acéticas en condiciones aerobias, comúnmente llamada “maderización”. Un subproducto de este proceso oxidativo es el acetato de etilo, el principal responsable del carácter organoléptico picado acético de un vino, que se hace evidente cuando su concentración supera los 200 mg l⁻¹ [8,9].

1.1.2.3. Compuestos nitrogenados

Los compuestos nitrogenados son esenciales para el crecimiento de las levaduras responsables del desarrollo de los procesos fermentativos y poseen cierta influencia en la calidad del vino; si estos compuestos no son completamente utilizados durante la fermentación, la probabilidad de una refermentación o un ataque bacteriano, aumenta [13].

Los aminoácidos son estimulantes de las bacterias lácticas responsables de la fermentación maloláctica (MLF), se estima que once aminoácidos son removidos en su totalidad durante dicho proceso [5,8,13]. La Tabla 3 muestra los aminoácidos presentes en uva de la especie *Vitis vinífera* y el intervalo de concentración en el que se encuentran [5].

Tabla 3. Contenido de aminoácidos en uva de la especie *Vitis vinífera* [5].

Aminoácido	Intervalo, mg/100 ml	Aminoácido	Intervalo, mg/100 ml
Alanina	5.0-167.1	Isoleucina	0.2-10.0
Ácido γ -aminobutírico	2.8-131.1	Leucina	0.3-8.5
Arginina	7.0-236.0	Lisina	0.3-4.4
Asparagina	<4.8	Metionina	0.3-1.8
Ácido aspártico	2.2-30.6	Ornitina	Trazas
Cisteína	Ultratrazas	Prolina	0.9-349.0
Cistina	0.2-2.1	Serina	5.0-55.0
Fenilalanina	2.9-7.8	Treonina	4.2-42.4
Ácido glutámico	5.4-182.3	Triptófano	2.2-6.5
Glutamina	<415.9	Tirosina	1.0-4.6
Glicina	0.3-3.1	Valina	3.6-9.4
Histidina	<14.3	Ácido pipeólico	Trazas

Es importante mencionar que el contenido de aminoácidos es función del contenido de nitrógeno del suelo, y que éste varía con la cantidad de fertilizantes utilizados en los viñedos. La Tabla 4 muestra el cambio en el contenido de aminoácidos presentes en la bebida final con respecto a la cantidad de fertilizantes nitrogenados utilizados [5,13].

Tabla 4. Relación entre el contenido de aminoácidos en el vino y la cantidad de fertilizante utilizado en la producción de la uva [5].

Variedad		Aris ^b				Riesling		
Fertilizante	N	0.5	2.0	4.0	6.0	0.5	2.0	4.0
	K	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
	P	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Nitratos	N ₂ O ₅	3.5	n.r.	n.r.	29.0	1.5	2.0	4.4
Aminoácidos, mg l⁻¹	Aminoácidos totales	960	1598	2651	2972	800	1064	2445
	Histidina	n.r.	20	15	36	16	23	48
	Lisina	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	13
	Arginina	480	801	853	828	174	314	810
	NH ₃	29	39	82	87	10	20	53
	Ácido aspártico	39	22	57	70	49	36	63
	Treonina	26	38	44	88	30	49	123
	Serina ^a	128	204	470	495	65	78	305
	Glutamina	222	203	216	268	132	-	370
	Prolina	n.r.	n.r.	480	590	123	136	179
	Glicina	n.r.	n.r.	7.5	4.5	n.r.	7.5	22.5
	Alanina	63	107	252	318	86	136	454
	Valina	19	27	27	46	22	40	45
	Metionina	n.r.	15	21	-	21	30	24
	Isoleucina	12	25	31	31	26	31	23
	Leucina	20	35	50	45	33	42	32
Fenilalanina	22	62	66	67	31	48	49	

^a Serina + Glutamina-NH₂ + Ácido aspártico-NH₂.

^b Nueva variedad de vino.

n.r. No reportado.

- Valor menor al límite de detección.

1.1.2.4. Antioxidantes

La oxidación es uno de los procesos más importantes en el deterioro de los productos alimenticios, ya que tiene grandes repercusiones en el color, sabor y textura del alimento. Los antioxidantes protegen la calidad de un alimento y previenen su deterioro ocasionado por reacciones oxidativas [14,15].

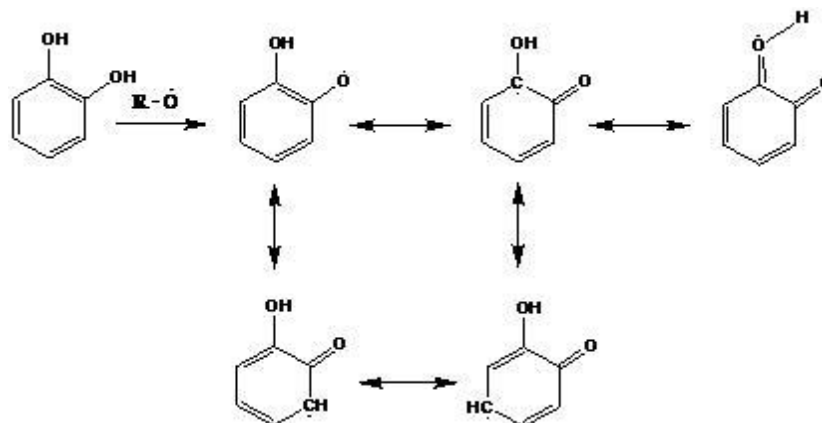
En años recientes, la restricción en el uso de antioxidantes sintéticos como butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroxiltolueno (BHT), ha causado un incremento en el interés por los antioxidantes naturales [16].

Los antioxidantes contenidos en los alimentos, compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides) en su mayoría, han demostrado tener un impacto positivo sobre la salud debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antialérgicas y antihemorrágicas. Los principales flavonoides que tienen un efecto benéfico son: canferol, cuercitina, mirecetina y catequina [17].

Los antioxidantes pueden ser encontrados en una gran diversidad de alimentos, generalmente en aquellos de origen vegetal, las fuentes más ricas en ellos son: el café, el té, las nueces, el chocolate y especialmente las frutas, incluyendo las frutas en conservas como el vino, los jugos y las frutas secas. Las cantidades de antioxidantes consumidas diariamente varían entre 25 mg a 1 g, y dependen de la elección personal [7,14,18-20].

Diversos estudios han demostrado que los vinos son una fuente rica en antioxidantes naturales, muchos de ellos originarios de la uva, y otros de las barricas en las que fueron añejados [5-9].

La actividad antioxidante de los vinos se debe específicamente a la presencia de bencenodiolos, estos compuestos reaccionan con los oxidantes formando un radical estabilizado por resonancia (Esquema 1), la semiquinona, que es capaz de persistir lo suficiente para reaccionar con otro radical semiquinona sin abstraer protones de otras sustancias, dando lugar a una quinona y un fenol [6,7].



Esquema 1. Estabilización por resonancia del radical semiquinona [7].

El uso de sulfitos en el proceso de producción de los vinos intensifica las propiedades antioxidantes de los vinos reduciendo y reciclando la quinona generada a fenol. Si esta quinona no es removida, eventualmente reaccionará con otros nucleófilos, si se trata de compuestos fenólicos, el resultado será el oscurecimiento del vino [9].

En las uvas, la cáscara y las semillas son las fuentes primarias de los compuestos fenólicos, mientras que el jugo y la pulpa muestran niveles bajos de estos compuestos. La Tabla 5 muestra la distribución de los compuestos fenólicos en la uva [7].

Tabla 5. Contenido de compuestos fenólicos en uva roja y verde. Base húmeda. [7]

Tejido	% (masa/masa)	Uva roja, mg Kg⁻¹	Uva verde, mg Kg⁻¹
Cáscara	15	1800	900
Pulpa	1	40	35
Jugo	78	210	175
Semillas	6	3500	2800
Total	100	5550	3910

Existen diversos factores que afectan la concentración de compuestos fenólicos en el vino, el principal se refiere al tipo de vino. Los vinos blancos inician su proceso fermentativo en ausencia de la cáscara y semillas de la uva (hollejo), por el contrario, el vino tinto proviene de la fermentación del mosto en presencia de hollejo, razón por la cual este último suele ser más rico en antioxidantes fenólicos [1,6]. En la Tabla 6 se reportan los niveles de compuestos fenólicos (flavonoides y no flavonoides) presentes en vinos tintos y blancos [7].

Tabla 6. Valores típicos de concentración (mg l^{-1}) de compuestos fenólicos en vinos blancos y tintos [7].

Compuesto fenólico	Vino blanco		Vino tinto	
	Joven ^a	Añejo ^b	Joven ^a	Añejo ^b
No flavonoides				
Hidroxicinamatos	154	130	165	60
Ácidos benzoicos	10	15	60	60
Taninos hidrolizables	0	100	0	250
Estilbenos (resveratrol)	0.5	0.5	7	7
Total	164.5	245.5	232	377
Flavonoides				
Monómeros flavonol	25	15	200	100
Proantocianidinas y taninos condensados	20	25	750	1000
Flavonoles	-	-	100	100
Antocianinas	-	-	400	90
Otros	-	-	50	75
Total	45	40	1500	1365
Total	209.5	285.5	1732	1742

^a < 6 meses en barricas de fermentación.

^b ~1 año para blancos, ~2 años para tintos en barricas de fermentación.

1.2. Técnicas de caracterización de vinos

Cada vino guarda ciertas propiedades organolépticas que lo diferencian de otros; estas propiedades están estrechamente relacionadas con su composición química y le otorgan al vino cierta calidad [4]. Por esta razón, en los últimos años ha surgido un gran interés en el estudio químico de los vinos por parte de la industria vinícola, con el objetivo de asegurar que el producto que llega al consumidor cuenta con las características correspondientes a su tipo y denominación de origen [21-26].

Existen diferentes técnicas para la caracterización de vinos desde el análisis amperométrico y espectrofotométrico para la determinación de su capacidad antioxidante hasta la combinación de técnicas espectroscópicas y cromatográficas con el análisis quimiométrico de los datos proporcionados por las dichas técnicas.

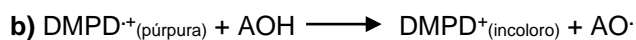
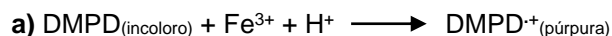
1.2.1. Capacidad antioxidante

Los antioxidantes naturales presentes en bebidas y alimentos han atraído el interés de diversos grupos de investigación debido a sus propiedades terapéuticas. Una dieta rica en antioxidantes puede prevenir enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (oxidación de lipoproteínas de baja densidad) como cáncer, arterioesclerosis y enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer y Parkinson) [17,24].

Los métodos para determinar la capacidad antioxidante se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o la muestra. Por otra parte, hay ensayos que se basan en la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo. Los distintos métodos difieren en el agente oxidante, en el sustrato empleado, en la medida del punto final, en la técnica instrumental utilizada y en las posibles interacciones de la muestra con el medio de reacción [27].

Entre los ensayos más utilizados para determinar la actividad antioxidante total (AAT) podemos mencionar el desarrollado por Miller *et al.* [28] basado en la inhibición del radical libre conocido como ABTS^{•+} formado a partir de la reacción del ácido azinobis (3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico) con el radical ferrimioglobina a su vez generado de la reacción de metmioglobina con H₂O₂ en presencia de peroxidasa. El radical ABTS^{•+} es un compuesto cromógeno azul verdoso que absorbe a una longitud de onda de 734 nm. La AAT se puede determinar mediante titulaciones espectrofotométricas utilizando soluciones estándar de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). Los valores de concentración se expresan como capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox (CAET).

Un estudio más reciente realizado por Fogliano *et al.* [29] utiliza el radical DMPD^{•+} generado por la reacción entre *N,N*-dimetil-*p*-fenilendiamina (DMPD) y cloruro férrico, mostrada en el Esquema 2. El radical DMPD^{•+} presenta una coloración púrpura y es capaz de abstraer un hidrógeno de una sustancia antioxidante para formar el catión DMPD⁺ que es incoloro. Si se utilizan soluciones estándar de Trolox la actividad antioxidante se expresa como CAET.



Esquema 2. a) Formación del radical DMPD⁺ y **b)** reacción entre el radical DMPD⁺ y un compuesto antioxidante [29].

Los compuestos fenólicos suelen determinarse mediante el método Folin-Ciocalteu que se basa en la reacción entre el reactivo Folin-Ciocalteu y los compuestos fenólicos en presencia de carbonato de sodio. El contenido de fenoles se determina mediante una comparación con los valores obtenidos para soluciones estándar de ácido gálico [30, 31].

McMurrough y Baert [32] proponen un método para la determinación de flavonoides basado en la condensación entre el *p*-dimetilaminocinnamaldehído y los flavonoides, los compuestos formados absorben a 640 nm. Los resultados se dan en mg l⁻¹ equivalentes de (+)-catequina (EC).

Mediante el uso de los ensayos antes descritos se han realizado numerosos estudios para la caracterización de vinos con base en su actividad antioxidante. Landrault *et al.* [33] evaluaron la capacidad antioxidante de 54 vinos franceses de diferentes variedades y viñedos utilizando el ensayo basado en la reacción del radical ABTS⁺ y el análisis de diversos compuestos fenólicos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Vinson *et al.* [19] se basaron en el método Folin-Ciocalteu para determinar el contenido de compuestos fenólicos de vinos obteniendo resultados significativamente diferentes para vinos tintos y blancos. Pellegrini *et al.* [11] determinaron el contenido total de fenoles y flavonoides, así como la AAT expresada en CAET de 21 vinos tintos jóvenes italianos (*Vini Novelli*) haciendo una clara distinción entre vinos cuya maceración fue carbónica o tradicional.

De Beer *et al.* [34] realizaron un análisis discriminante canónico de los datos obtenidos de la determinación de AAT, flavonoles, ácido tartárico, antocianinas (monoméricas y poliméricas) y fenoles logrando clasificar 46 vinos tintos y 40 vinos blancos de origen sudafricano.

Finalmente, un estudio más cercano al propuesto en este trabajo fue realizado por Mannino *et al.* [35], en dicho estudio se determina la capacidad antioxidante de 16 vinos tintos y 6 vinos blancos utilizando el método Folin-Ciocalteu y la determinación de catequinas empleando la metodología FIA (análisis por inyección en flujo); los resultados mostraron una mayor capacidad antioxidante para vinos tintos que para vinos blancos.

1.2.2. Técnicas cromatográficas

Las técnicas cromatográficas han sido ampliamente utilizadas en el estudio de los vinos, la principal razón es que proporcionan una gran cantidad de información sobre los componentes minoritarios de los vinos, que son difíciles de detectar mediante otras técnicas instrumentales.

García-Jares *et al.* [25] analizaron compuestos volátiles de vinos por cromatografía de gases (CG) utilizando un inyector de temperatura variable y aplicando técnicas multivariantes de análisis supervisadas, método del K entorno más próximo (k-NN) y no supervisadas, análisis de componentes principales (ACP) y análisis clúster (AC); para discriminar entre vinos que provengan o no de la región Rias Baixas y que pretendan venderse con la denominación de origen controlada de dicha región.

Kim *et al.* [36] caracterizaron cuatro tipos de vinos de acuerdo al contenido de aminoácidos determinado por cromatografía de gases y clasificados por técnicas multivariantes, obteniendo diagramas de estrella característicos para cada muestra. Nouandje *et al.* [37] determinaron ciertas correlaciones entre la concentración de aminoácidos y aminos biogénicas durante el añejamiento de vinos tintos franceses. Romero *et al.* [38] evaluaron los perfiles de aminos proporcionados por HPLC utilizando ACP, AC y ADL (análisis discriminante lineal) para clasificar vinos tintos, blancos y rosados. Csomós *et al.* [24] cuantificaron aminos biogénicas y antocianinas en 25 vinos húngaros aplicando un ACP a cromatogramas obtenidos por OPLC (cromatografía líquida planar a sobrepresión). García-Villar *et al.* [39] reportaron la caracterización de vinos mediante el uso de HPLC para la cuantificación de aminos biogénicas y APC encontrando diferencias clara entre vinos jóvenes y vinos reserva.

1.2.3. Espectroscopia infrarroja

En lo que concierne a la espectroscopia infrarroja Edelman *et al.* [23] han reportado un método de discriminación para vinos tintos australianos de diferentes cultivos de uva, utilizando extractos fenólicos obtenidos por extracción en fase sólida (EPS) y analizándolos por espectroscopia de reflectancia total atenuada (ATR) del infrarrojo medio en un intervalo de 940 a 1760 cm^{-1} , aplicando el modelo multivariante SIMCA (modelado independiente suave de analogía de clase) y ACP, encontrando cinco grupos de vinos diferentes.

Más tarde, Nieuwoudt *et al.* [26] aplicaron los métodos multivariantes mencionados a espectros infrarrojos de 329 vinos con el propósito de diseñar un modelo discriminante basado en el contenido de glicerol en las muestras.

Existen estudios para espectroscopia del infrarrojo cercano para el análisis de muestras de vinagre de vino y de alcohol en un rango de longitud de onda entre 1100 y 2500 nm, utilizando el método de corrección ortogonal de señal (OSC) con el objetivo de identificar muestras de vinagre de vino adulteradas con vinagre de alcohol [40].

1.2.4. Resonancia magnética nuclear

La resonancia magnética nuclear es una de las técnicas instrumentales más útiles en el análisis de productos alimenticios debido a que proporciona una gran cantidad de información sobre los componentes minoritarios de las muestras. Pereira *et al.* [41] realizaron la caracterización y clasificación de uvas maduras utilizadas para la fabricación de vinos en Bordeaux, Francia aplicando ACP a los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN) obtenidos de las muestras.

En cuanto al análisis de vinos, existen estudios realizados en vinos de diferentes denominaciones de origen, Košir y Kidrič [42] realizaron experimentos de ^1H -RMN para clasificar vinos blancos provenientes de Slovenia con ayuda de un AC de los compuestos minoritarios identificados por experimentos de resonancia ^1H y ^{13}C , en una (1D RMN) y dos dimensiones (2D RMN), específicamente experimentos TOCSY, COSY, NOESY, HSQC y HMQC.

Du *et al.* [22] proponen la clasificación de vinos mediante el ACP de los espectros de ^1H -RMN obtenidos de tres regiones chinas distintas Shacheng, Changli y Yantai, los resultados mostraron diferencias significativas entre los vinos provenientes de cada región.

También existen trabajos enfocados en cómo el pre-tratamiento de las muestras de vinos puede afectar el análisis, Amaral y Caro [43] proponen tres formas diferentes para el análisis por ^1H -RMN de vinos blancos brasileños: el análisis directo de las muestras, su liofilización y su concentración sometiéndolas a un flujo de nitrógeno, siendo esta última técnica la que dio mejores resultados, ya que fue posible cuantificar algunos compuestos minoritarios.

Un espectro de ^1H -RMN nos proporciona una gran cantidad de información tanto cualitativa como cuantitativa acerca de una muestra, Avenzoza *et al.* [12] han evaluado la cinética de los ácidos láctico y málico durante la fermentación maloláctica de muestras de mosto con ayuda de la espectroscopia cuantitativa de ^1H -RMN (q-HRMN).

El estudio de vinos por medio de RMN se hace cada vez más sofisticado y se ha llegado a diseñar nuevas técnicas de análisis con el objetivo de reducir la posible contaminación de las muestras de vino, Weekley *et al.* [44] desarrollaron un dispositivo que permite el análisis de botellas cerradas de vino.

1.3. Análisis por inyección en flujo

Debido a la necesidad de medir muchos parámetros rápidamente en la misma muestra, así como la búsqueda de realizar un análisis de forma rápida, económica y simple, se han desarrollado sistemas continuos de flujo para llevar a cabo automáticamente la determinación de más de una especie por muestra inyectada [45].

Los métodos automáticos continuos son aquellos procesos analíticos en los que la concentración del analito se mide sin interrumpir un flujo de líquido o gas. Las muestras y reactivos se introducen de manera sucesiva y a intervalos regulares de tiempo en un canal por el que fluye un líquido, que los transporta hacia el detector, donde originan una señal transitoria, cuya altura máxima se relaciona con la concentración del analito en la muestra y se relaciona con la sensibilidad y el límite de detección del sistema [46].

Dentro de los métodos automatizados continuos existen dos tipos; segmentados, (análisis en flujo segmentado, SFA) y no segmentados. Entre los últimos se encuentra el análisis por inyección en flujo (FIA) y se diferencia de los clásicos porque el flujo no está segmentado por burbujas de aire, la muestra es inyectada en lugar de aspirada, y en el momento de la detección no se alcanza ni el equilibrio físico ni el químico [45-47].

FIA no es un concepto fácil de definir, usualmente se presentan dos definiciones de FIA la “académica” y la “industrial”. Un ejemplo de definición académica es la siguiente [47-48]:

"Información obtenida a partir de un gradiente de concentración formado de una inyección de una zona de fluido bien definida y dispersada en un flujo no segmentado de un transportador"

Una definición industrial típica describe a FIA como [47-48]:

"Una tecnología analítica sencilla y versátil para la automatización del análisis químico en vía húmeda, basada en la manipulación física o química de una zona de muestra dispersada como consecuencia de la inyección de ésta en el flujo de una disolución transportadora y que puede ser detectada en flujo continuo"

Sin duda alguna, se prefiere la definición académica ya que explica de mejor forma lo que es análisis por inyección en flujo (FIA).

FIA fue introducido en 1975 por Ruzicka y Hansen, y desde entonces ha tenido una gran aceptación mundial. Existen tres razones principales por las cuales FIA ha tenido esta gran aceptación [46,47]: sus fundamentos son fáciles de entender e implementar, la instrumentación es muy sencilla y barata, además de que la automatización de procedimientos analíticos en vía húmeda es sencilla.

Las características más destacadas de FIA son [45]:

- Flujo no segmentado
- Inyección directa
- Dispersión parcial controlada
- Tiempo de operación reproducible

Los elementos esenciales de un montaje FIA básico son los siguientes:

a) Unidad de propulsión. Establece un caudal lo más constante posible de una disolución que lleva disuelto un reactivo o hace de simple portador. Puede ser una bomba peristáltica, un sistema de presión gaseosa, o bien, la fuerza de gravedad [45].

El sistema de propulsión más habitual en FIA es una bomba peristáltica que normalmente tiene varios canales (tubos flexibles) que permiten establecer el flujo, no sólo de las muestras sino también de los reactivos. El caudal viene determinado por el diámetro de los tubos y la velocidad de los rodillos. Este tipo de bomba proporciona un flujo pulsado, la duración del pulso decrece con el número de rodillos usados y con su diámetro, por ello se han propuesto diferentes sistemas de atenuación de pulsos [49].

b) Sistema de inyección. Permite insertar o introducir en el flujo un volumen exactamente medido de la muestra con una gran reproducibilidad de operación y sin interrumpir el mismo. Los sistemas más usados son la válvula rotatoria y el inyector proporcional. Ambos proporcionan volúmenes inyectados variables y reproducibles, alojados en bucles o loops, son rápidos y convenientes para operar manualmente [45].

El sistema de inyección más utilizado es la válvula de cuatro vías o rotatoria hexagonal. Consiste en seis orificios (tres entradas y tres salidas) y puede adoptar dos posiciones, En la posición de llenado, se pasa la disolución de la muestra por el loop que tiene un volumen predeterminado [47].

c) Sistema de transporte y reacción. Tiene la función primaria de transportar por el canal fluyente a lo largo del sistema FIA y permitir, donde sea apropiado, desarrollar una reacción en la extensión adecuada. Este sistema sirve para unir las diferentes partes del sistema FIA. El sistema de transporte consiste, normalmente, en una zona de tubo de pequeño diámetro interno (entre 0.1 y 2.0 mm), que se llama reactor, y que es donde tiene lugar el transporte con o sin proceso adicional [45].

d) Sistema de detección. Permite la medida continua de una propiedad de la muestra o de su producto de reacción, proporcionando información cuali y cuantitativa de la misma. Se trata de un instrumento de medida (colorímetro, fotómetro, fluorímetro, potenciómetro, etc.) que dé la señal continua a un registrador y/o microprocesador. Los

detectores usados en FIA deben, idealmente, estar dotados de características como, bajo volumen de la celda de flujo y ruido, señal independiente del caudal, respuesta rápida y lineal en un amplio intervalo de concentración y elevada sensibilidad [46, 47].

La metodología FIA ha sido utilizada con prácticamente todas las técnicas analíticas de detección, ópticas (espectroscópicas y no espectroscópicas), electroquímicas (amperometría, potenciometría, conductimetría, coulometría) y termoquímicas [45]. El uso de la técnica amperométrica ha promovido el desarrollo de multitud de celdas y electrodos, además del estudio de los principios que describen el comportamiento de estos dispositivos como partes del sistema FIA [49].

1.4. Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (ACP) es un método no supervisado de análisis, puesto que *a priori* no se conoce la existencia de categorías, lo que se pretende es explorar una matriz de datos. El ACP se utiliza para reducir la cantidad de datos cuando existe correlación entre las variables; es un método descriptivo, es decir, todas las variables se encuentran al mismo nivel [22,26,50].

El objetivo del ACP es condensar la información dada por una serie de variables correlacionadas o cerradas (dependientes entre ellas), en un número más restringido de variables no correlacionadas (independientes), reduciendo la dimensionalidad del problema desde p variables originales hasta dos o tres dimensiones conservando la mayor cantidad de información posible. Para ello se parte de dos hipótesis [51]:

- 1) No todos los objetos contienen información relevante sobre las muestras u objetos.
- 2) Algunas variables están correlacionadas entre sí por lo que la reducción en su número no implica una pérdida significativa de información.

Es importante mencionar que en componentes principales se debe trabajar con las variables originales estandarizadas, media cero y varianza uno; si una variable tiene una varianza mucho mayor a las demás, entonces esta variable controlará la primera componente principal. La estandarización evita lo anterior otorgándoles a todas las variables el mismo peso [52].

La idea principal del ACP es encontrar componentes principales también llamadas variables latentes, que sean combinaciones lineales de las variables originales, conocidas como variables manifiestas, que describen cada muestra. Para construir las componentes principales partimos de p variables e i objetos, cuya matriz se muestra en la Tabla 7 y la transformamos en las respectivas combinaciones lineales [53].

Tabla 7. Matriz X de p variables originales para i objetos.

		Variables				
Objetos	X_1	X_2	X_3	...	X_p	
1	a_{11}	a_{12}	a_{13}	...	a_{1p}	
2	a_{21}	a_{22}	a_{23}	...	a_{2p}	
...	
i	a_{i1}	a_{i2}	a_{i3}	...	a_{ip}	

$$Z_1 = a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + a_{13}X_3 + \dots + a_{1p}X_p$$

La formación de las componentes principales parecería un ejercicio sin sentido, pues a n variables originales le corresponderían n variables latentes y no existiría reducción alguna de datos; sin embargo las componentes principales se eligen de forma que la primera componente principal (CP_1), Z_1 , recoja la mayor parte de la variación o varianza presente en el conjunto de datos, la segunda (CP_2), Z_2 , recoja la siguiente mayor parte y así sucesivamente [52]. Por consiguiente cuando exista cierta correlación entre las nuevas variables, el número de CPs útiles será mucho menor que el número de variables originales [22,26,50-52].

Existen ciertas restricciones para el cálculo de componentes principales, las más importantes son la ortogonalidad y la varianza máxima. Las componentes principales deben ser ortogonales entre sí, significa que deben formar ángulos rectos unas con otras, y por consiguiente, su covarianza debe ser igual a cero [52].

Los vectores $a_i = (a_{i1} + a_{i2} + a_{i3} + \dots + a_{ip})$ nos indican el peso o contribución de cada variable original en la componente principal y reciben el nombre de autovectores, loadings o eigenvectores. Los objetos tienen nuevas coordenadas en la base formada por las componentes principales, esas nuevas coordenadas se denominan scores o puntuaciones [50].

Para ejemplificar lo anterior de una forma gráfica, supondremos la existencia de siete objetos y dos variables originales, por consiguiente, la formación de dos componentes principales. En la Figura 2a se muestra una serie de datos graficados en sus coordenadas originales y se muestra a las componentes principales como un giro de los ejes originales, de forma tal que la primera componente principal se encuentre en dirección de máxima varianza y en ángulo recto con la segunda componente principal. En la Figura 2b se muestra claramente como es la primera componente principal la que explica la mayor parte de la varianza [52].

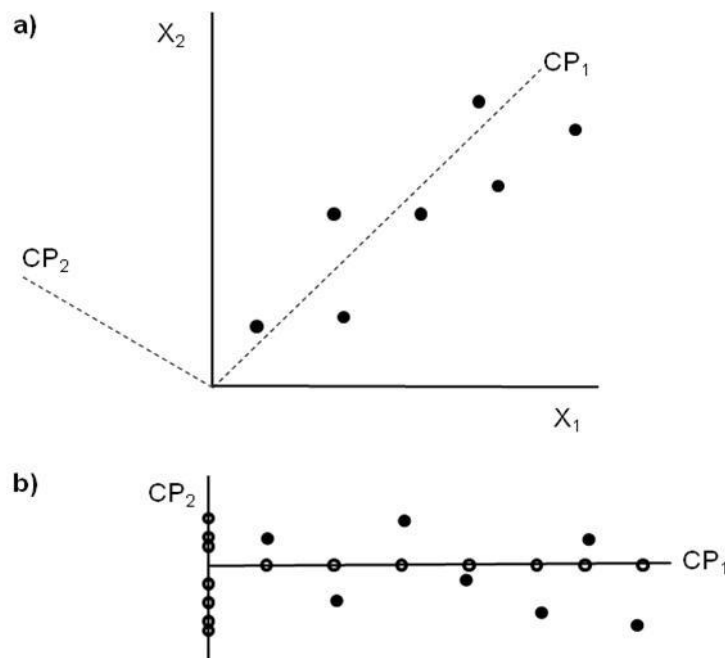


Figura 2. ACP para dos variables originales y siete objetos. **a)** Diagrama que ilustra las dos componentes principales CP_1 y CP_2 para las dos variables originales X_1 y X_2 . **b)** Puntos referidos a los ejes de las componentes principales.

● Puntos de datos ○ proyección sobre los ejes [52].

La agrupación de los objetos se lleva a cabo a partir del gráfico generado por las dos componentes principales, de esta forma el ACP nos ayuda a establecer una clasificación para un grupo de muestras a partir de una gran cantidad de información descrita por un gran número de variables originales, que se reducirá a un número menor de componentes principales [50].



CAPÍTULO 2
OBJETIVOS

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- Desarrollar estrategias analíticas que permitan la clasificación de vinos de diferente tipo y origen.

2.2. Objetivos específicos

- Diseñar, validar y aplicar una nueva metodología de flujo para la determinación amperométrica de la capacidad antioxidante en muestras de vinos.
- Aplicar la resonancia magnética nuclear de protón y el análisis de componentes principales en la clasificación de vinos de diferente tipo y origen.



CAPÍTULO 3
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1. Muestras

Las muestras de vino de distintas denominaciones de origen fueron adquiridas en establecimientos comerciales. La Tabla 8 muestra las principales características de las muestras de vino.

Tabla 8. Principales características de las muestras de vino analizadas.

Muestra	Tipo	País de origen	Tipo de cultivo	Cosecha
1	Blanco	Alemania	Riesling	2003
2	Blanco	Alemania	Krötenbrunnen	2005
3	Blanco	Alemania	Liebfraumilch Rheinhessen	2005
4	Blanco	Alemania	Krötenbrunnen Rheinhessen	2005
5	Blanco	Alemania	Liebfraumilch Nahe	2006
1	Tinto	Chile	Cabernet Sauvignon	2002
2	Tinto	Chile	Cabernet Sauvignon	2005
3	Tinto	Chile	Cabernet Sauvignon	2006
4	Tinto	Chile	Cabernet Sauvignon	2004
5	Tinto	Chile	Merlot	2005
1	Tinto	México	n.r.	n.r.
2	Tinto	México	Vergel	2006
3	Tinto	México	Cabernet Sauvignon	n.r.
4	Tinto	México	n.r.	n.r.
5	Tinto	México	Cabernet Sauvignon	2006

n.r. No reportado por el fabricante

3.2. Disoluciones

Todas las disoluciones fueron preparadas disolviendo el respectivo reactivo en agua desionizada con una conductividad específica menor de $0.1 \mu\text{S cm}^{-1}$.

- **Disoluciones patrón de Trolox:** Se prepararon estándares de Trolox a diferentes concentraciones (0.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 60.0, 80.0 y 100.0 mg l^{-1}), a partir de una disolución madre de 1000 mg l^{-1} , la cual fue preparada disolviendo la respectiva cantidad de Trolox en 1.1 ml de etanol y aforando a 10.0 ml con agua desionizada. Las distintas disoluciones estándar fueron renovadas semanalmente; tanto la disolución madre como las disoluciones patrón se mantuvieron en refrigeración a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

- **Disolución transportadora:** Se utilizó una disolución tampón de citratos (pH 4.5, 0.5 mol l^{-1}). Para la optimización se prepararon disoluciones transportadoras de citratos de diferentes valores de pH (3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 y 5.5).

- **Disolución de Ce(IV):** Se preparó una disolución de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ de concentración $1.82 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, estandarizada con sulfato ferroso amoniacal. A partir de la disolución anterior se preparó una nueva disolución de Ce(IV) $1.82 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$.

3.3. Equipo

En el sistema de flujo diseñado, la propulsión de las diferentes disoluciones se realizó con una bomba peristáltica (marca Gilson modelo Minupuls 3) de cuatro canales con tubos de propulsión de la misma marca. Ésta mantiene un flujo constante de transportador y muestras en el montaje.

La introducción de las muestras y patrones en el flujo del transportador se realizó utilizando una válvula de inyección de cuatro vías Rheodyne y los diferentes componentes del montaje se unieron entre sí por tubos de teflón de 0.8 mm de diámetro interno de la marca Omnifit, ligadores y terminales Gilson.

La detección se llevó a cabo con ayuda de una celda tubular que contenía los electrodos de trabajo y auxiliar de pasta de carbono (parafina-grafito 5:95) y un electrodo de referencia Ag/AgCl de fabricación propia [54].

El registro de las señales analíticas se realizó utilizando un potenciostato AUTOLAB PGSTAT30 (Eco Chemie, Holanda), conectado a una computadora equipada con el software GPES versión 4.6, que registra las señales analíticas (intensidad) en función del tiempo.

Las valoraciones espectrofotométricas realizadas de acuerdo a la metodología de referencia [55] se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo Lambda 40 conectado a una computadora equipada con el software Uv-WinLab Versión 2.80 que registra las señales analíticas como absorbancia.

La eliminación del agua de las muestras de vino se realizó en una liofilizadora Freezone 4.5 (Labconco, E.U.A.).

Los espectros de ^1H -RMN de las muestras se obtuvieron en un espectrómetro de RMN Jeol Eclipse 400 conectado a una computadora equipada con el software Delta versión 4.3.6.

3.4. Análisis de muestras

3.4.1. Determinación de la capacidad antioxidante de vinos

3.4.1.1. Metodología FIA

Para llevar a cabo la determinación amperométrica de la capacidad antioxidante de las muestras de vino se diseñó un sistema FIA de un solo canal (Figura 3). El sistema de análisis optimizado comienza con la inyección de una alícuota de 50.0 μl de muestra en el caudal donde fluye la disolución transportadora. La muestra se acondiciona en el reactor R (14.0 cm) y se detecta amperométricamente a un potencial de 0.75 V (vs Ag/AgCl). A este potencial el Trolox contenido en los estándares se oxida de acuerdo a la reacción representada en el Esquema 3 [56].

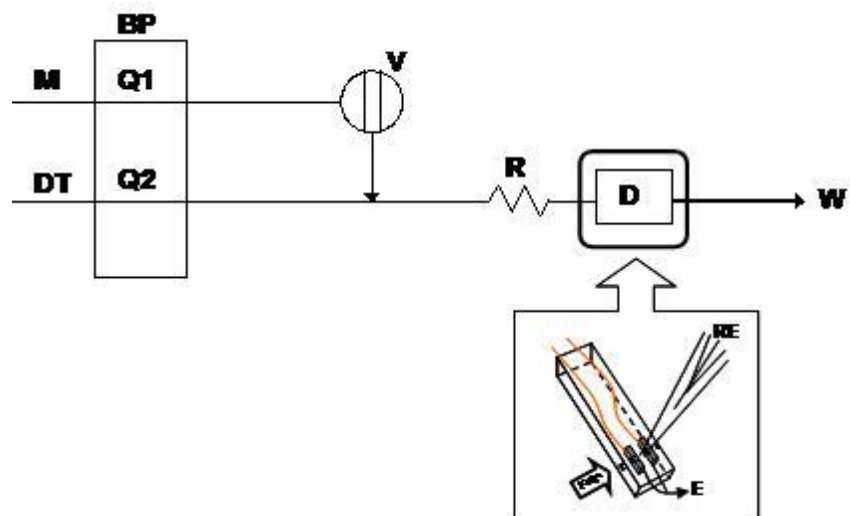
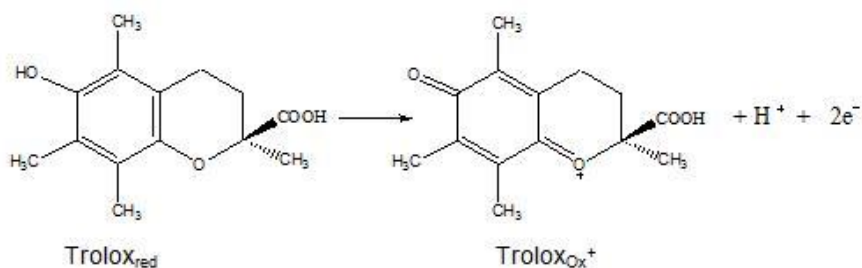


Figura 3. Esquema del montaje FIA utilizado en la determinación de la capacidad antioxidante de vinos. BP, bomba peristáltica; Q, caudal; M, muestra; DT, disolución transportadora; V, válvula de inyección; R, reactor; D, detector tubular; E, electrodo auxiliar y de trabajo; RE, electrodo de referencia (Ag/AgCl); W, desecho



Esquema 3. Semi-reacción de oxidación de Trolox.

3.4.1.2. Metodología de referencia

Se utilizó como metodología de referencia el método espectrofotométrico basado en la capacidad reductora del Ce(IV) para determinar capacidad antioxidante [55].

Las correspondientes curvas de valoración espectrofotométricas se llevaron a cabo a una longitud de onda de 320 nm. Las muestras de vino se diluyeron 1:10, hasta un volumen de 10 ml, posteriormente fueron valoradas mediante adiciones de 0.1 ml de la disolución Ce(IV) $1.82 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Se realizó la valoración de un blanco cuyo resultado fue restado al obtenido para cada muestra. Una solución de Trolox de concentración $1.81 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ fue valorada con Ce(IV) $1.82 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ con el objetivo de encontrar la relación estequiométrica de la reacción.

3.4.2. Clasificación de vinos con base en su perfil de ^1H -RMN

Se tomaron 3 ml de muestra de vino y se mantuvieron en congelación a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ durante 12 h para después ser liofilizadas a una temperatura de $-50\text{ }^\circ\text{C}$ y a 1.33×10^{-3} mBar de vacío. Las muestras fueron redisueltas en 0.5 ml D_2O y se colocaron en tubos de 5 mm para RMN. Los espectros de ^1H -RMN fueron obtenidos con un tiempo de relajación de 4 s y 26 escanes para obtener un total de 32 000 datos con un tiempo de adquisición de 5.46 min.

El análisis de componentes principales (ACP) de los espectros ^1H -RMN obtenidos fue realizado con ayuda del software Minitab versión 13.0 para Windows



CAPÍTULO 4
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de la capacidad antioxidante de vinos

4.1.1. Optimización de las variables electroquímicas

Con el propósito de obtener la mayor sensibilidad, antes de evaluar las variables del sistema FIA se evaluaron las variables electroquímicas. Las variables optimizadas fueron pH y potencial de trabajo.

Para realizar los experimentos requeridos se establecieron los siguientes valores para las variables del sistema FIA: un volumen de inyección de 60 μl , un caudal de 0.7 ml min^{-1} y una longitud de reactor de 60 cm. La detección se llevó a cabo a un potencial de 0.70 V (vs Ag/AgCl). Las variables fueron evaluadas de forma univariable en un intervalo de concentración de Trolox de 15.0 a 60.0 mg l^{-1} .

Los valores de pH evaluados fueron impuestos utilizando disoluciones amortiguadoras de citratos de concentración 0.5 mol l^{-1} en un intervalo de 3.00 a 5.00. La Tabla 9 muestra la sensibilidad analítica a los diferentes valores de pH de trabajo. El pH seleccionado para este análisis es 4.5, a pesar de que la repetitividad obtenida no es la mejor de la serie de experimentos, el valor no supera el máximo tolerable en el análisis en flujo (%DER < 5%) [47].

Tabla 9. Sensibilidad analítica de la línea de calibrado (media y %DER, n=3) en función del pH.

Unidades de sensibilidad analítica $\mu\text{A l mg}_{\text{Trolox}}^{-1}$

pH	Sensibilidad analítica	%DER
3.00	0.0094	1.78
3.50	0.0117	1.15
4.00	0.0118	1.14
4.50	0.0128	1.98
5.00	0.0124	0.01

Para determinar el potencial de trabajo se realizaron experimentos para un intervalo de 0.6 a 0.8 V (vs Ag/AgCl), manteniendo los valores de las variables FIA ya establecidos y un pH de 4.5. Los valores de sensibilidad obtenidos para cada experimento se muestran en la Tabla 10, observando un máximo de sensibilidad a un potencial de 0.75 V, fijando éste como potencial de trabajo. Este valor coincide con el potencial de oxidación reportado para el análisis del Trolox mediante voltamperometría cíclica [56].

Tabla 10. Sensibilidad analítica de la línea de calibrado (media y %DER, n=3) en función del potencial de trabajo (V). Unidades de sensibilidad analítica $\mu\text{A l mg}_{\text{Trolox}}^{-1}$

Potencial de trabajo	Sensibilidad analítica	%DER
0.60	0.0135	3.22
0.65	0.0152	2.65
0.70	0.0117	1.63
0.75	0.0189	3.47
0.80	0.0174	0.02

4.1.2. Optimización de las variables del sistema FIA

De acuerdo a estudios anteriores los principales parámetros operacionales correspondientes al sistema FIA: volumen de inyección de la muestra, caudal de la disolución transportadora y longitud del reactor, afectan significativamente la respuesta de los detectores amperométricos [57].

La evaluación de las variables FIA se basó en un diseño factorial completo a dos niveles, el cual nos permitió valorar el efecto que ejercen algunos factores experimentales sobre la sensibilidad del método desarrollado (pendiente). Con este fin se estudiaron el efecto del volumen de inyección, el caudal de la solución transportadora y la longitud del reactor. Se precisan, por tanto $2^3 = 8$ experiencias, que al realizarse por duplicado se convierten en 16.

Como se sabe la pendiente (sensibilidad de calibrado), es función de la altura de las señales analíticas, por lo que los 16 experimentos del diseño factorial se realizaron sólo con una disolución patrón de Trolox de $15.0 \text{ mg}_{\text{Trolox}} \text{ l}^{-1}$; esto con la finalidad de ahorrar tiempo y reactivos.

Cada factor tomó dos niveles que se denominaron alto (+) y bajo (-). La elección de estos niveles, indicados en la Tabla 11, se realizó de acuerdo a experiencias previas [54].

Tabla 11. Niveles de los factores a optimizar.

Factores	Nivel	
	Bajo (-)	Alto (+)
Volumen de inyección (Vi) μl	30.0	100.0
Caudal (Q) ml min^{-1}	0.5	1.5
Longitud del reactor (R) cm	30.0	90.0

El diseño factorial consiste en medir la respuesta para todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores elegidos, con base en lo anterior se obtuvo el diagrama correspondiente a 3 inyecciones repetidas de una solución patrón de $15.0 \text{ mg}_{\text{Trolox}} \text{ l}^{-1}$. Las medidas se realizaron aleatoriamente para no introducir efectos extraños adicionales. Los valores experimentales obtenidos para las diferentes combinaciones de los niveles se encuentran en la Tabla 12.

Tabla 12. Combinación de niveles y resultados obtenidos.

Vi	Q	R	Señal analítica (μA)		Media
-	-	-	0.1139	0.1418	0.1278
+	-	-	0.3551	0.4159	0.3855
-	+	-	0.2567	0.3736	0.3152
-	-	+	0.1004	0.1275	0.1139
-	+	+	0.1176	0.1431	0.1304
+	-	+	0.2373	0.2986	0.2679
+	+	-	0.4841	0.5605	0.5223
+	+	+	0.3255	0.3458	0.3356

La estimación del efecto que ejerce cada factor e interacción, suma de cuadrados y varianza, así como el factor F calculado se reportan en la Tabla 13.

Tabla 13. Factores F y valores p obtenidos en el diseño factorial utilizado para evaluar las condiciones de análisis.

Factor	Efecto	SC Factor	Varianza	$F_{\text{calculado}}$	% Contribución
Vi	0.2060	0.1698	0.1698	92.0061	57.65
Q	0.1021	0.0417	0.0417	22.5849	14.15
R	-0.1257	0.0632	0.0632	34.2706	21.48
Vi-Q	0.0002	0.0000	0.0000	0.0001	0.00
Vi-R	-0.0264	0.0028	0.0028	1.5107	0.95
Q-R	-0.0600	0.0144	0.0144	7.8055	4.89
i-Q-R	0.0255	0.0026	0.0026	1.4053	0.88

Los factores resaltados son estadísticamente significativos en el ANOVA de los resultados ($F_{\text{calculado}} > 5.32$ para un 95% de nivel de confianza).

El efecto que ejerce cada factor se calculó mediante la expresión siguiente:

$$\text{Efecto} = \frac{1}{4} [\sum (y_+) - \sum (y_-)]$$

siendo y_+ los valores medios de la “función objetivo”. en este caso el valor de la señal analítica, la cual es función de la pendiente, cuando el factor o interacción tiene signo (+) y y_- cuando tiene signo (-).

Para contrastar qué efectos son significativos, se puede utilizar el análisis de varianza (ANOVA) suponiendo que hay homogeneidad de las varianzas. Se puede demostrar que en un experimento de dos niveles, como éste, las sumas de cuadrados necesarios se pueden calcular de los efectos estimados utilizando la siguiente expresión:

$$\text{Suma de cuadrados} = N \frac{(\text{efecto estimado})^2}{4}$$

donde N es el número total de medidas incluyendo las réplicas. En este caso N es 16 ya que se hicieron dos medidas, una réplica de la otra, por cada combinación de los niveles del factor.

Las varianzas de cada factor e interacción se calcularon mediante las sumas de cuadrados correspondientes:

$$\text{Varianza} = \frac{\text{suma de cuadrados}}{\text{g.d.l.}}$$

cada cuadrado medio es simplemente la correspondiente suma de cuadrados. Para contrastar si un efecto es significativo se compara el cuadrado medio con el cuadrado medio del error (residual). Éste se calcula de las medidas individuales y de la media de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Suma de cuadrados residual} = \sum x_{ijk}^2 - \sum \frac{T_{ij}^2}{n}$$

donde $\sum x_{ijk}^2$ es la suma de los cuadrados de las medidas individuales que aparecen en la Tabla 13 y $\sum \frac{T_{ij}^2}{n}$ es la sumatoria del cuadrado de la suma de las medidas replicadas entre el número de medidas repetidas de cada experiencia. En la presente evaluación el residual obtenido fue de 0.0018 con 8 grados de libertad.

Para determinar si la influencia de un factor o interacción es significativa se lleva a cabo una prueba de significación F. Siendo $F_{\text{calculado}}$ el cociente de la varianza de cada uno de los factores y de los residuales nos proporciona el $F_{\text{calculado}}$ y $F_{\text{crítico}}=F_{1,8}=5.32$ (95 %). si $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabulado}}$ se acepta la hipótesis alternativa que postula que “la influencia del factor individual o la mezcla de factores es significativo”.

Llegando a la conclusión de que influían significativamente sobre la respuesta el volumen de inyección, la longitud del reactor, el caudal y la interacción entre el caudal y la longitud del reactor, siendo los dos primeros factores los de mayor contribución. Por la razón anterior se decidió fijar el caudal del transportador a un valor determinado, eligiéndose un caudal de 1.0 min⁻¹ que permite disminuir el gasto de reactivos sin afectar la velocidad de análisis.

Uno de los problemas generados al utilizar un diseño factorial estriba en la posible mala elección de los niveles para cada factor, los cuales si se encuentran demasiado alejados pueden caer en ambos lados de un máximo, y aún así dar lugar a una diferencia en la respuesta no significativa.

Una vez identificados los diferentes factores e interacciones que afectan a la respuesta de nuestro sistema FIA, se necesitan otros métodos para determinar la combinación de los niveles del factor que proporcionan la respuesta óptima.

Por lo anterior, se utilizó el método SIMPLEX súper modificado (SMS) [52], para bajo los criterios de este método, modificar los valores del volumen de inyección y la longitud del reactor (Figura 4) para obtener la mayor altura de señal posible y de esta forma lograr una mejor sensibilidad. En la Figura 5 se muestran los puntos seleccionados y la evolución del SIMPLEX, así como el valor de la altura de la señal obtenida en cada punto experimental. Al cabo de 5 experiencias se alcanza el valor máximo de altura de señal, cuando el volumen de inyección es de 50 μL y la longitud de reactor es de 14 cm.

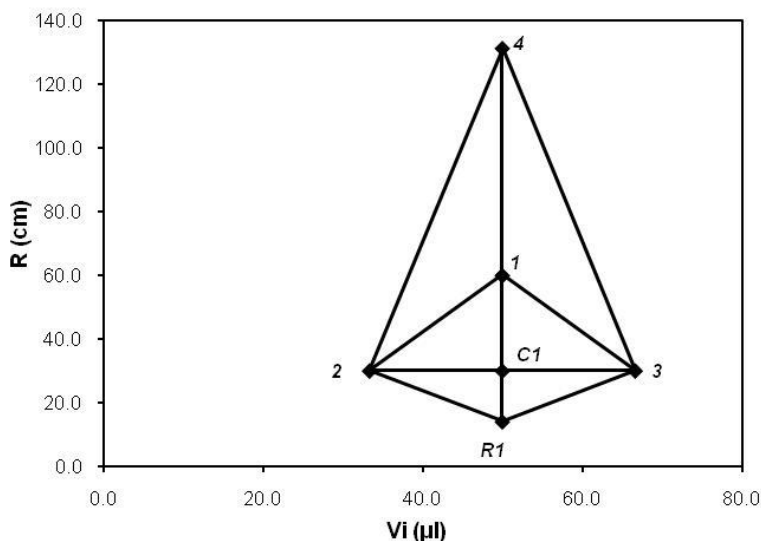


Figura 4. Evolución experimental del volumen de inyección (μL) y longitud del reactor (cm) durante la optimización mediante SIMPLEX súper modificado.

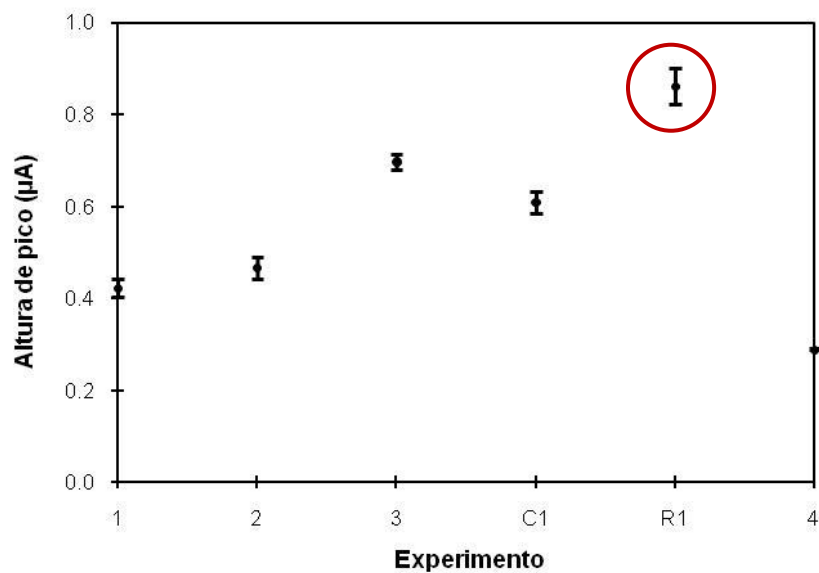


Figura 5. Evolución de la altura de la señal analítica (μA) durante los experimentos realizados en la optimización utilizando el método SIMPLEX súper Modificado.

4.1.3. Parámetros analíticos

Bajo las condiciones optimizadas según se describió, se realizaron las líneas de calibrado utilizando disoluciones estándar en el intervalo de concentraciones entre 0.0 y 100.0 $\text{mg}_{\text{Trolox}} \text{ l}^{-1}$. La altura de la señal obtenida (μA) se midió por triplicado, construyéndose la correspondiente línea de calibrado a partir de las alturas medias. La línea de calibrado muestra una dependencia lineal entre la intensidad media y la concentración de Trolox presente en la disolución estándar. El FIagrama obtenido en condiciones óptimas y los parámetros de regresión de las líneas de calibrado se muestran en la Figura 6 y la Tabla 14, respectivamente.

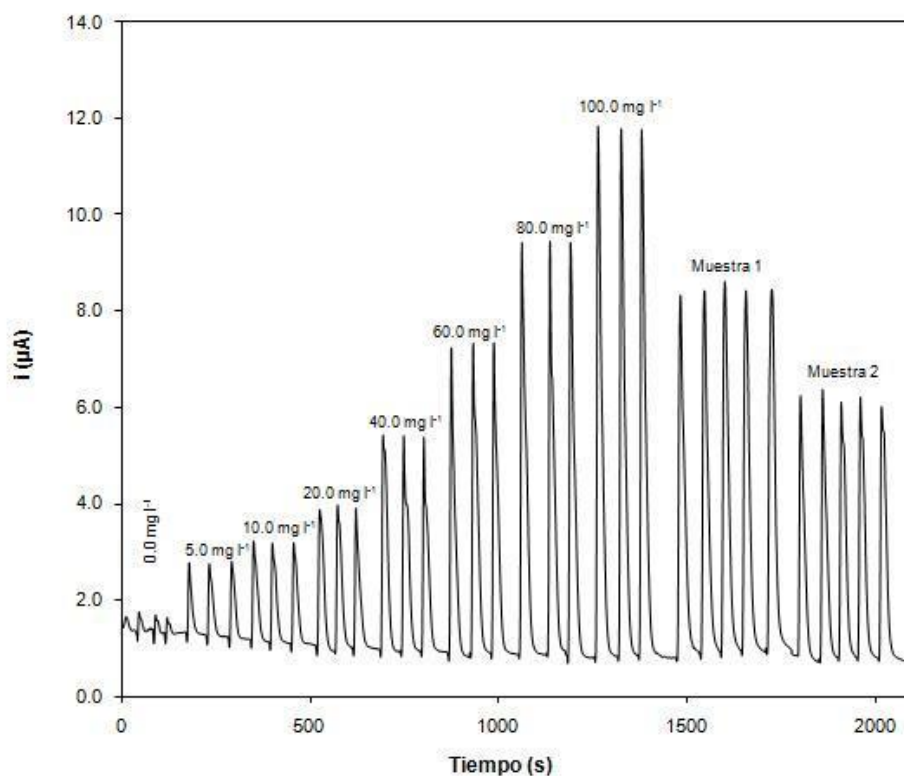


Figura 6. FIAgrama de disoluciones patrón de Trolox de 0.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 60.0, 80.0 y 100.0 mg l⁻¹ y muestras de vino. Q, 1.0 ml min⁻¹; V_i, 50.0 μl; R, 14.0 cm.

Tabla 14. Parámetros de regresión de las líneas de calibrado, intensidad (μA) vs concentración (mg_{Trolox} l⁻¹).

Parámetro	Línea calibrado Trolox
Raíz cuadrada de la varianza residual, s _e	0.0332
Ordenada en el origen, b ₀ ±ts(b ₀)	0.2699±0.4334
Pendiente, b ₁ ±ts(b ₁)	0.0947±0.0082
Intervalo lineal (mg l ⁻¹)	5.0-100.0
Limite de detección (mg l ⁻¹)	1.0
Repetitividad (%DER, n=3, 60.0 mg l ⁻¹)	0.68
Reproducibilidad (%DER, n=3, 60.0 mg l ⁻¹) ^a	2.86
Velocidad de muestreo (muestra h ⁻¹)	60.0

^a Resultado de tres medidas realizadas en diferentes días.

4.1.4. Comparación con la metodología de referencia

El método FIA optimizado se aplicó a muestras de vinos blancos disponibles en el mercado, las cuales fueron abiertas instantes antes de ser analizadas. Los resultados obtenidos para cada una de las muestras, mostrados en la Tabla 15, se expresan como capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox (CAET) en $\text{mg}_{\text{Trolox}} \text{ l}^{-1}$, y se calcularon por interpolación en la línea de calibrado. La CAET determinada se presenta como la media de 5 determinaciones independientes.

Las muestras también fueron analizadas por el método de referencia [56], realizando valoraciones espectrofotométricas con soluciones de Ce(IV) por triplicado, de la misma forma que en la metodología FIA, las muestras de vino blanco fueron abiertas instantes antes de ser analizadas.

Para cada muestra se obtuvo el promedio de la CAET usando ambos métodos y comparándose los resultados mediante una prueba t, asumiendo varianzas desiguales (confirmando con una prueba F). Los valores de $t_{\text{calculada}}$ fueron comparados con $t_{\text{crítica}}$ a 2 grados de libertad al 95% de confianza ($t=4.30$). Este análisis reveló que no hay diferencias significativas entre los resultados provenientes de cada método. Adicionalmente las muestras analizadas por la metodología FIA presentan una mejor repetitividad (%DER <2.0) que la metodología de referencia.

Tabla 15. CAET (media y %DER) en muestras de vino determinada por el método de flujo propuesto y por valoraciones UV-Vis. Unidades de concentración, $\text{mg}_{\text{Trolox}} \text{ l}^{-1}$.

Muestra	FIA n=5	UV-Vis n=3	$t_{\text{calculada}}$
1	68.2 (1.1)	66.1 (6.9)	0.76
2	58.5 (1.0)	57.9 (2.9)	0.48
3	63.3 (1.7)	59.6 (3.8)	2.45
4	61.2 (0.9)	57.3 (7.3)	2.02

$t_{\text{crítica}} = 4.30$ a 2 grados de libertad para un 95% de nivel de confianza

4.1.5. Análisis de muestras

Una vez optimizado y validado el método propuesto, se procedió a analizar 15 muestras de vinos tintos y blancos de diferentes denominaciones de origen, los resultados de CAET expresada como $\text{mg}_{\text{Trolox}} \text{ l}^{-1}$ se muestran en la Tabla 16.

Los valores obtenidos para las muestras analizadas son inferiores a los obtenidos en análisis anteriores (Tabla 15), esto se debe a que las muestras analizadas llevaban abiertas algunos meses, afectando su capacidad antioxidante debido a la oxidación causada por el O_2 atmosférico; sin embargo se puede observar una clara diferencia entre la CAET de vinos tintos, con excepción de las muestras 2 y 4 de vinos tintos mexicanos cuya calidad es inferior al resto de las muestras, y la obtenida para vinos blancos.

Tabla 16. CAET (media y %DER, n=5) determinada en muestras de vinos de diferentes denominaciones de origen por el método de análisis propuesto. Unidades de concentración,

Muestra	$\text{mg}_{\text{Trolox}} \text{ l}^{-1}$		
	Vinos blancos	Vinos tintos	
	Alemania	Chile	México
1	29.78 (3.55)	68.14 (2.56)	70.97 (2.61)
2	7.28 (6.65)	59.50 (2.28)	14.63 (1.88)
3	8.86 (3.47)	51.17 (3.54)	37.09 (4.42)
4	8.19 (6.98)	75.28 (4.13)	15.64 (5.56)
5	9.12 (5.02)	91.64 (0.46)	61.19 (3.38)

Para comprobar lo dicho anteriormente, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y un modelo de efectos fijos. Las muestras de vino se agruparon de acuerdo a su tipo y origen, y corresponden a las columnas de la Tabla 16. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 17, a partir de dichos resultados se puede concluir que existe una diferencia significativa entre la capacidad antioxidante de las muestras ($F_{\text{calc}} > F_{\text{crit}}$).

Tabla 17. ANOVA de una vía de los grupos de muestras de vino de diferente tipo y origen analizados.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad (n)	Varianza (MS)	F _{calc}	F _{crit}
Entre grupos (A)	7983.91	2	3991.95	12.03	3.89
Dentro de los grupos (R)	3983.42	12	331.95		
Total	11967.32	14			

Para saber qué columna es la que difiere se utiliza la diferencia menos significativa (LSD), la cual se calcula a través de la expresión:

$$LSD = t_{crit} \sqrt{\frac{2MS_R}{n_A}}$$

el t_{crit} correspondiente a los grados de libertad de los residuales, en este caso 12, cuyo valor es 2.18 MS_R y n_A son la varianza residual y los grados de libertad entre grupos respectivamente. El valor obtenido es de 39.70, calculando la diferencia entre los promedio se observa que la columna que difiere significativamente es la correspondiente a los vinos blancos de origen alemán. La capacidad antioxidante esta relacionada al tipo de vino más que su origen, por lo que permite únicamente diferenciar entre vinos tintos y blancos.

4.2. Clasificación de vinos con base en su perfil de ¹H-RMN

En este apartado se discutirán los resultados obtenidos del análisis de componentes principales (ACP) de los espectros de ¹H-RMN de 15 muestras de vino de distintas denominaciones (Tabla 8).

4.2.1. Análisis de espectros de ¹H-RMN de vinos

La identificación de señales de los espectros de ¹H-RMN obtenidos, se realizó utilizando la información reportada por otros autores sobre estudios similares, en los que la muestra era disuelta en D₂O [12,22,43].

La Figura 7 muestra un espectro típico de ^1H -RMN de vino en un intervalo de desplazamiento químico (δ) entre 0.60 y 5.50 ppm, donde podemos observar las señales correspondientes a los compuestos mayoritarios presentes en el vino. En 4.78 ppm encontramos la señal de agua residual en la muestra, posteriormente a un desplazamiento de 4.50 ppm aparece un doblete correspondiente a β -glucosa. Entre 3.00 y 4.00 ppm existen una serie de señales múltiples que son atribuidas a los azúcares presentes en el vino (glucosa, fructosa y sacarosa) cuya asignación específica no es posible. En 3.54 ppm aparece una señal cuadruple para los protones del grupo metileno ($-\text{CH}_2-$) del etanol. En 2.56 ppm se encuentra una señal simple atribuida a los protones de los grupos metileno del ácido succínico, a un desplazamiento de 1.97 ppm aparecen los protones del grupo metilo ($-\text{CH}_3$) del ácido acético y finalmente en 1.05 ppm observamos una señal triplete relacionada a los protones del grupo metilo del etanol.

En la Figura 8 se muestra la ampliación de un espectro de ^1H -RMN de vino entre 0.60 y 3.00 ppm. Entre 2.78 y 2.70 ppm aparece una señal múltiple correspondiente a un protón diasterotópico del ácido málico. En 2.23 ppm se encuentra una señal múltiple atribuible a un protón unido a un carbono en posición beta de la prolina. A un desplazamiento igual a 1.60 ppm observamos una señal múltiple apenas perceptible correspondiente al aminoácido arginina. A frecuencia más baja se encuentra una señal triple atribuida al grupo metilo de la alanina. Los protones del grupo metilo del ácido láctico aparecen a un desplazamiento de 1.29 ppm con una señal doble.

La señal correspondiente al grupo metilo del etanol a un desplazamiento de 1.08 ppm muestra tres tripletes en lugar de uno, los tripletes que aparecen a ambos lados de la señal principal se denominan satélites y representan el acoplamiento con el 1.1 % de ^{13}C presente en etanol, al existir una concentración alta de etanol estas señales son visibles de forma que, no sólo se observa la señal de protón enlazado a ^{12}C , cuya abundancia es del 98.9%, sino que también se observan dichas señales satélite, que muestran la misma multiplicidad y un mismo valor de constante de acoplamiento ($J = 7.20$ Hz) que la señal principal.

Finalmente a un desplazamiento de 0.75 ppm encontramos una señal doble correspondiente a los dos grupos metilo del 2,3-butanodiol.

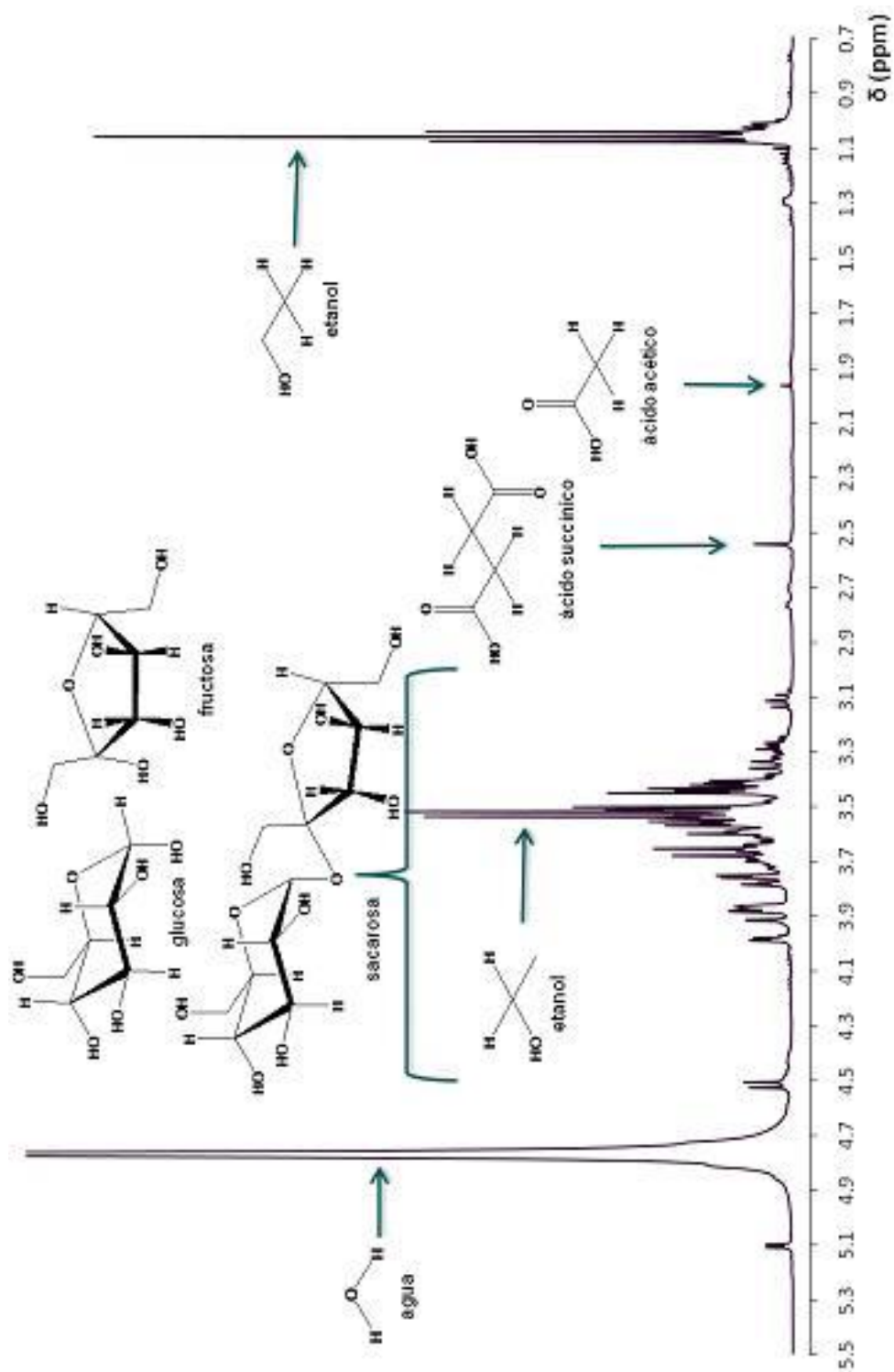


Figura 7. Espectro típico de ¹H-RMN.para vino. (Vino tinto chileno 1).

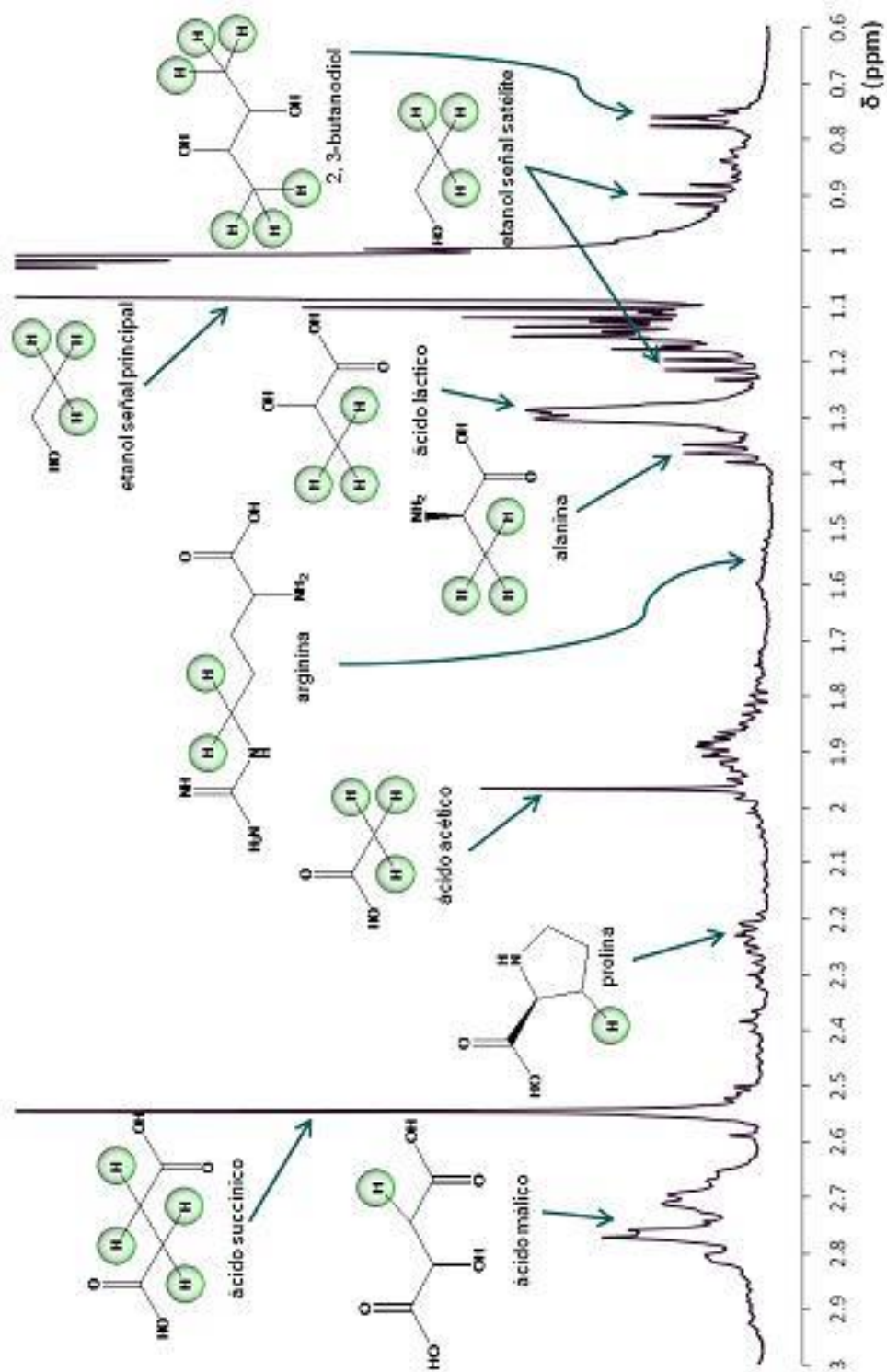


Figura 8. Ampliación de un espectro típico de ^1H -RMN para vino entre 0.60 y 3.00 ppm. (Vino tinto chileno 1).

4.2.2. Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (ACP) fue aplicado a los espectros de ^1H -RMN de las muestras de vino, generando 16 variables manifiestas (componentes principales) a partir de 16 variables originales, que incluían los valores de desplazamiento químico de los espectros obtenidos y los valores de intensidad para las 15 muestras de vino.

La matriz de datos original se redujo a 2 componentes principales de acuerdo la información proporcionada por el gráfico de sedimentación (Figura 9), en el que se observa una caída brusca en la segunda componente, lo que indica que las dos primeras componentes describen la mayor parte de la información útil para nuestro estudio.

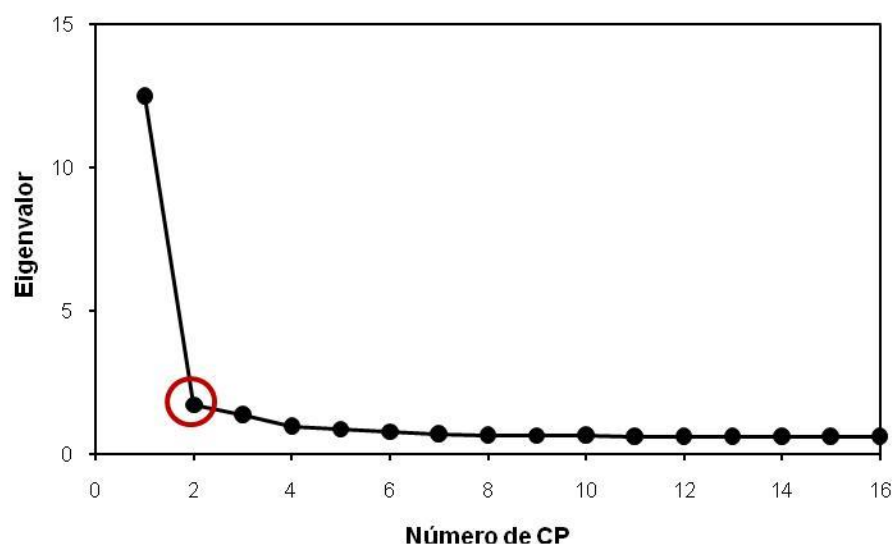


Figura 9. Gráfico de sedimentación de las componentes principales formadas.

Con el objeto de encontrar entre que valores de desplazamiento químico se encontraba la mayor contribución se graficó cada componente principal en función del desplazamiento químico. La Figura 10, muestra ciertas áreas de mayor contribución en ambas componentes, la primera es alrededor de 4.78 ppm y corresponde a la señal de agua residual en las muestras, la segunda corresponde a los azúcares: sacarosa, fructosa y glucosa, y se encuentra entre 3.00 y 4.00 ppm, finalmente se observa la señal de etanol y señales de menor intensidad de alcoholes, ácidos orgánicos y aminoácidos entre 0.60 y 3.00 ppm.

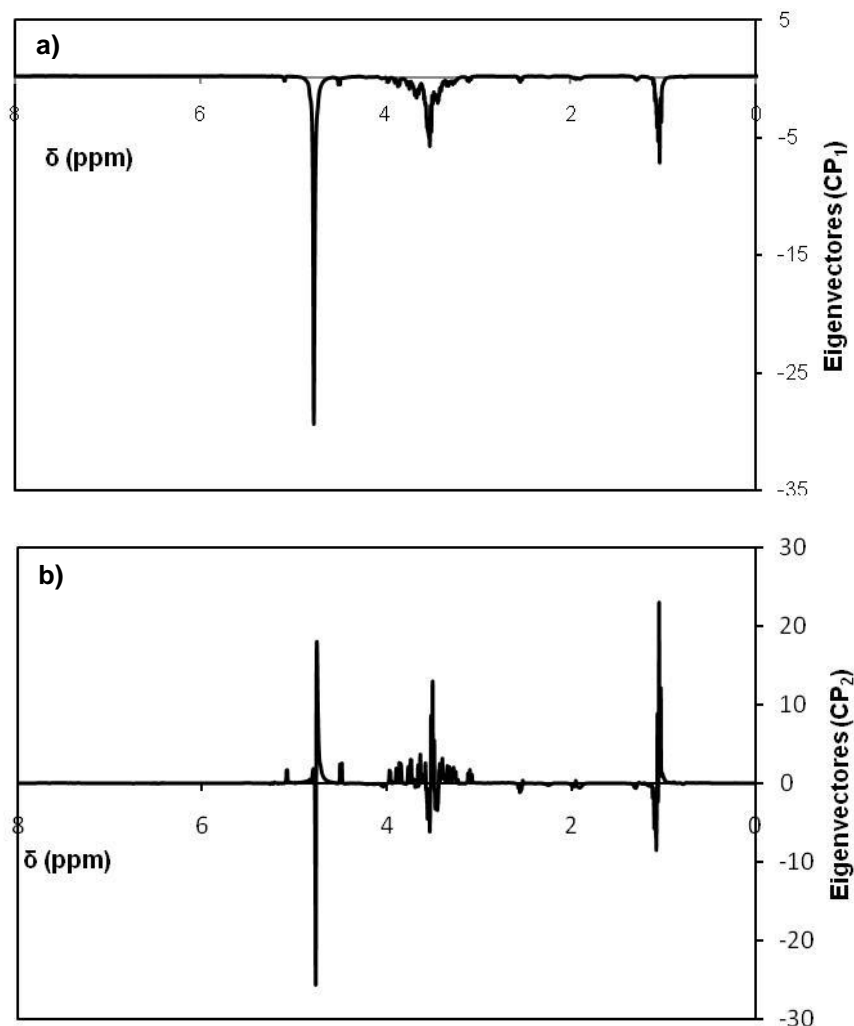


Figura 10. a) Gráfico de eigenvectores de la primer componente principal (CP₁). **b)** Gráfico de eigenvectores de la segunda componente principal (CP₂).

Con base en lo descrito anteriormente se tomaron 3 intervalos de desplazamiento químico, el primero comprende entre 4.00 y 5.50 ppm, el segundo corresponde a la zona de los azúcares y se encuentra entre 3.00 y 4.00 ppm; y por último, el tercero relacionado a los alcoholes, ácidos orgánicos y aminoácidos que aparecen entre 0.60 y 3.00 ppm. Se realizó el análisis de componente principales (ACP) para cada uno de los intervalos y sus respectivas combinaciones, así como para el total de los datos obtenidos que comprende un desplazamiento entre -2.00 y 12.00 ppm.

La Figura 11 muestra los resultados de los ACP realizados para cada intervalo de desplazamiento. Podemos observar que el gráfico de escores correspondiente a un intervalo de desplazamiento químico (δ) entre 4.00 y 5.50 ppm (Figura 11b) es el que explica la mayor parte de la varianza total (99.3%), sin embargo no es este análisis el que logra la mejor agrupación de las muestras. El ACP que comprende un intervalo de δ entre 0.60 y 3.00 ppm (Figura 11d) muestra la mejor clasificación de las muestras, a pesar de que este análisis tenga el menor tanto por ciento de varianza explicada (58.4%).

Es importante resaltar que la segunda componente principal alcanza su máximo (17.4%) en el ACP mostrado en la Figura 11d, y su mínimo en el análisis presentado en la Figura 11b (7.4%), que como se mencionó anteriormente no logra una buena agrupación de las muestras. Con base en lo anterior podemos concluir que la variable discriminante es la segunda componente principal.

El intervalo de desplazamiento químico utilizado para el ACP mostrado en la Figura 11d, contiene las señales correspondientes a alcoholes, ácidos orgánicos y aminoácidos, cuya concentración, específicamente la de ácidos orgánicos y aminoácidos, es variable entre las muestras de vino de distintas denominaciones de origen a causa de los diferentes factores de producción como el tipo de cultivo, las condiciones climáticas, las características del suelo y las técnicas de vinificación empleadas [4,5,8,9,13].

El análisis de componentes principales realizado a la matriz de datos de los espectros de $^1\text{H-RMN}$ en un intervalo de 0.60 a 3.00 ppm, nos permitió clasificar las 15 muestras de vinos en 3 grupos. El primero corresponde a los vinos blancos alemanes (blanco 2-5), con excepción de la muestra blanco 1. El segundo grupo incluye a los vinos tintos mexicanos (tinto 6-10) y a la muestra blanco 1. La tercera clasificación está conformada por los vinos tintos chilenos (tinto 1-5).

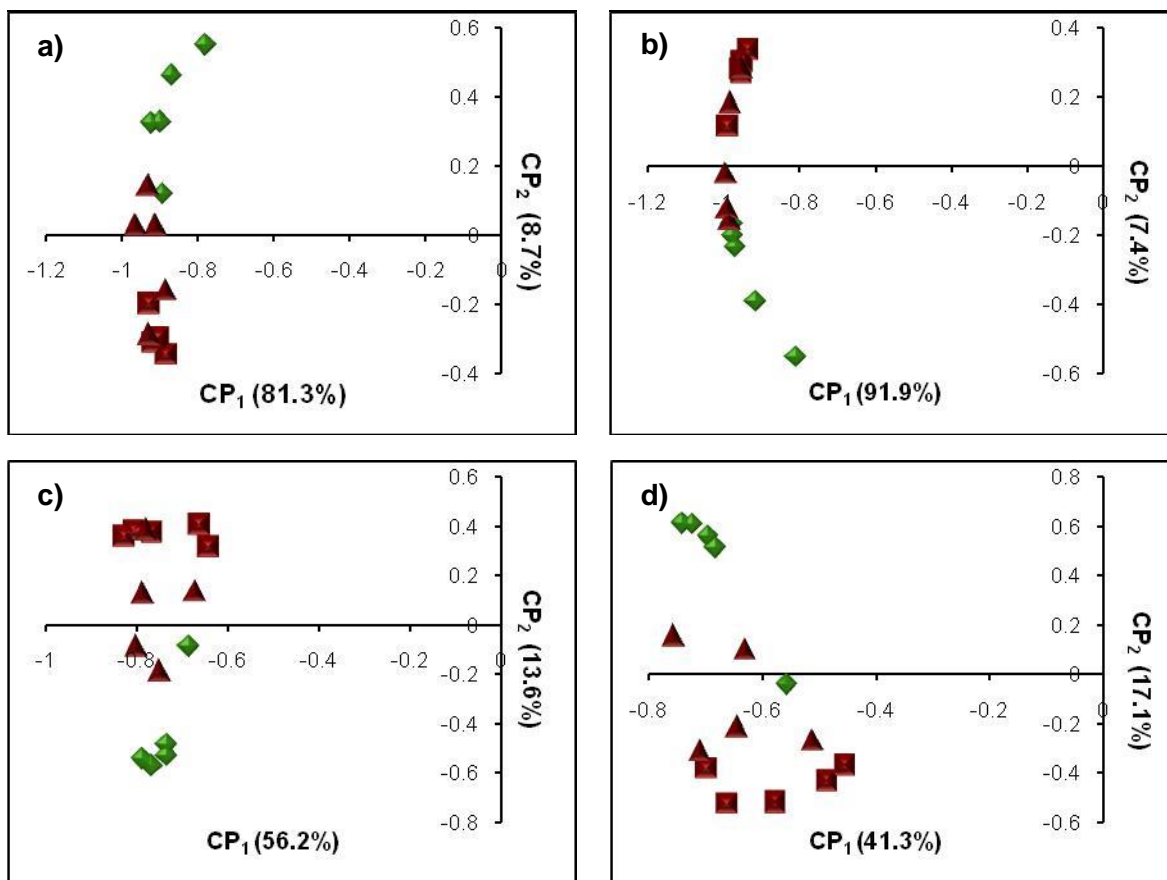


Figura 11. Gráficos de scores, CP₁ versus CP₂, de los diferentes rangos de desplazamientos químicos analizados. **a)** $\delta = 12.00 - -2.00$ ppm, 90% de varianza explicada. **b)** $\delta = 5.50 - 4.00$ ppm, 99.3% de varianza explicada. **c)** $\delta = 4.00 - 3.00$ ppm, 69.8% de varianza explicada. **d)** $\delta = 3.00 - 0.60$ ppm, 58.4% de varianza explicada.

◆ Vinos blancos alemanes ■ Vinos tintos chilenos ▲ Vinos tintos mexicanos

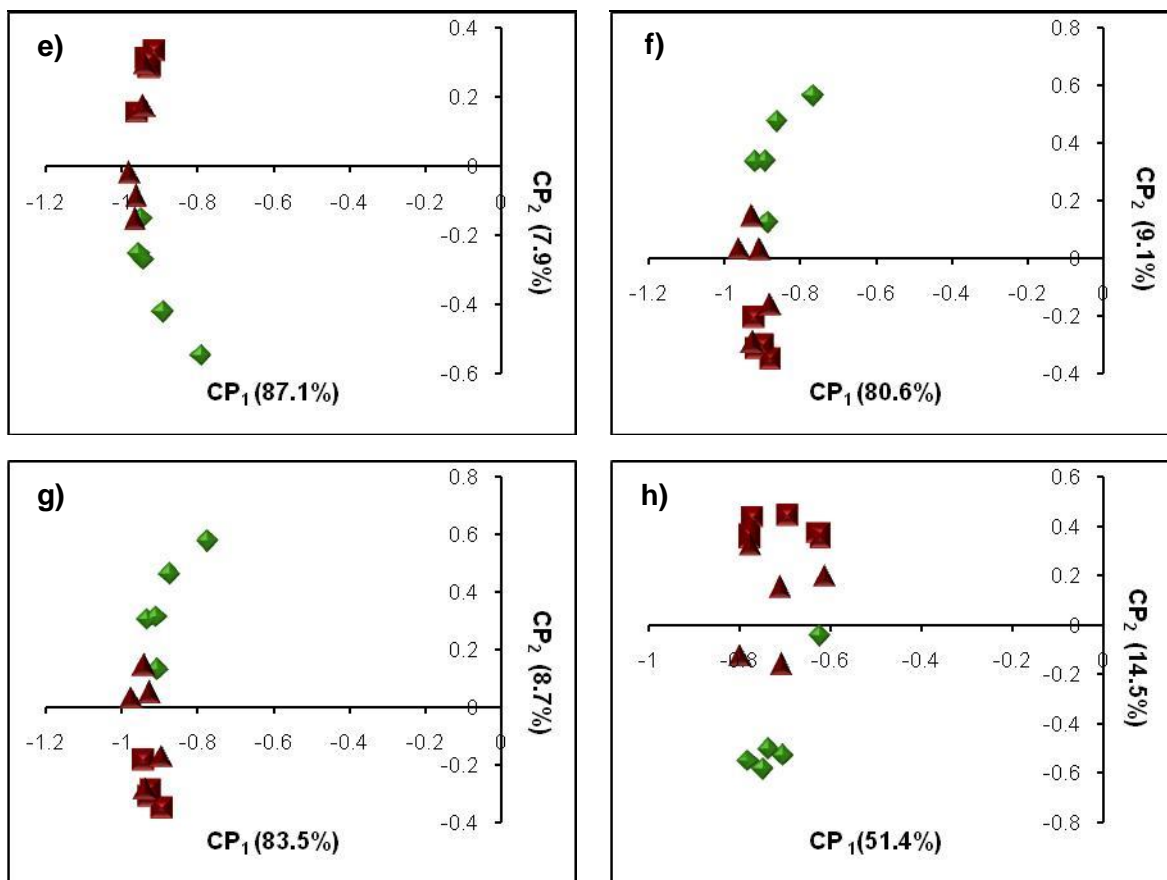


Figura 11 (continuación). Gráficos de escores, CP₁ versus CP₂, de los diferentes rangos de desplazamientos químicos analizados. **e)** $\delta = 5.50 - 3.00$ ppm, 95% de varianza explicada. **f)** $\delta = 5.50 - 0.60$ ppm, 89.7% de varianza explicada. **g)** $\delta = 5.50 - 4.00$ y $3.00 - 0.60$ ppm, 92.2% de varianza explicada. **h)** $\delta = 4.00 - 0.60$ ppm, 65.9% de varianza explicada.

◆ Vinos blancos alemanes ■ Vinos tintos chilenos ▲ Vinos tintos mexicanos



CAPÍTULO 5
CONCLUSIONES

5.CONCLUSIONES

- Se desarrolló un método de flujo para la determinación de la capacidad antioxidante de vinos con detección amperométrica, que permite el análisis de 60.0 muestras h^{-1} con un mínimo consumo de reactivos y una adecuada reproducibilidad y repetitividad (%DER < 5).
- Los resultados de capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox (CAET) obtenidos para distintas muestras de vino por el método de análisis por inyección en flujo (FIA) desarrollado, fueron comparados con los obtenidos mediante una metodología de referencia basada en las valoraciones espectrofotométricas de las muestras de vino con Ce(IV), mediante una prueba t ($\alpha=0.05$), concluyendo que no existían diferencias significativas entre los resultados obtenidos para cada muestra.
- El análisis estadístico de los resultados obtenidos para la CAET en los vinos analizados, mostró diferencias entre los grupos, siendo los vinos blancos alemanes los que diferían significativamente. Lo anterior indica, que la determinación de la capacidad antioxidante de vinos, permite clasificarlos de acuerdo a su tipo y no a su origen.
- Se eligieron dos componentes principales, de acuerdo al gráfico de sedimentación, para llevar a cabo la clasificación mediante análisis de componentes principales (ACP) de 15 muestras de vinos de distinto tipo y origen con base en su perfil de 1H -RMN.
- La mejor clasificación de vinos se obtuvo en un intervalo de desplazamiento químico de 0.60-3.00 ppm, con un 58.4 % de varianza explicada, lo que indica que las muestras de vino se clasifican en función al contenido de ácidos orgánicos, aminoácidos y alcoholes, hecho directamente relacionado con la variedad de uva empleada para la elaboración del vino, la ubicación geográfica, las características del suelo y las condiciones climáticas.

- El ACP consiguió la clasificación rápida de las muestras en tres grupos distintos, el primero corresponde a los vinos blancos alemanes, el segundo a los vinos tintos mexicanos y el tercero a los vinos tintos chilenos. La clasificación minimiza el tiempo y la cantidad de análisis requeridos para lograr el mismo objetivo.



CAPÍTULO 6
REFERENCIAS

6.REFERENCIAS

- [1] Hazelton, N. *American wines*. Grosset & Dunlap Publishers. E.U.A., **1976**.
- [2] Dominé, A. *El vino*. Könemann. Alemania, **2005**.
- [3] Álvarez, J. *La viña, la vid y el vino*. Editorial Trillas. México, **1991**.
- [4] Peynaud, E.; Blouin, J. *El gusto del vino*. Ediciones Mundi-Prensa. España, **2002**.
- [5] Dinsmoor, A. *Chemistry of winemaking*. Editorial ACS. E.U.A., **1985**.
- [6] Varnan, A. H.; Sutherland, J. P. *Bebidas. Tecnología, química y microbiología*. Editorial Acribia. España, **1994**.
- [7] Waterhouse A. L. The phenolic wines antioxidants. En: *Handbook of antioxidants*. Cadenas E. Dekker. E.U.A., **2001**.
- [8] Usseglio-Tomasset, L. *Química enológica*. Ediciones Mundi-Prensa. España, **1998**.
- [9] Aleixandre, J. L.; Martínez, F. *Manual de enología*. Universidad Politécnica de Valencia. España, **1998**.
- [10] Atanassov, G. T.; Lima, R. C.; Mesquita, R. B. R.; Rangel, A. O. S. S.; Tóth, I. V. Spectrophotometric determination of carbon dioxide and sulfur dioxide in wines by flow injection. *Analisis*. **2000**, 28, 77-82.
- [11] Pellegrini, N.; Simonetti, P.; Gardana, C.; Brenna, O.; Brighenti, F. ; Pietta, P. Polyphenol content and total antioxidant activity of *Vini Novelli* (Young red wines). *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 732-735.
- [12] Avenoza, A.; Busto, J. H.; Canal, N.; Peregrina, J. M. Time course of the evolution of malic and lactic acids in the alcoholic and malolactic fermentation of grape must by quantitative ¹H RMN (qHRMN) spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 4715-4720.
- [13] Bell, S. J.; Henschke, P. A. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust. J. Grape Wine R.* **2005**, 11, 242-295.
- [14] Chen, J.; Gorton, L.; Akesson, B. Electrochemical studies on antioxidants in bovine milk. *Anal. Chim. Acta.* **2002**, 474, 137-146.
- [15] Cosio, M. S.; Buratti, S.; Mannino, S.; Benedetti, S. Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labitae family. *Food Chem.* **2006**, 97, 725-731.
- [16] Branen, A. L. Toxicology and biochemistry of butylatedhydroxy anisole and butylated hidroxy toluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1975**, 52, 59-63.

- [17] Rice-Evans, C.A.; Parker, L. *Flavonoids in health disease*. Dekker. E.U.A., **1998**.
- [18] Heinonen, I. M.; Lehtonen, P. J.; Hopia, A. I. Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 25-31.
- [19] Vinson, J. A.; Hao, Y.; Su, X.; Zubik, L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Vegetables. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3630-3634.
- [20] Sousa, W. R.; da Rocha, C.; Cardoso, C. L.; Silva, D. H. S.; Zanoni, M. V. B. Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltametric methods. *J. Food Compos. Anal.* **2004**, *17*, 619-633.
- [21] Latorre, M. J.; García-Jares, C.; Mèdina, B.; Herreo, C. Pattern recognition analysis applied to classification of wines from Galicia (Northwestern Spain) with certified brand of origin. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1451-1455.
- [22] Du, Y. Y.; Bai, G. Y.; Zhang, X. ; Liu, M. L. Classification of wines based on combination of ¹H RMN spectroscopy and principal component analysis. *Chinese J. Chem.* **2007**, *25*, 930-936.
- [23] Edelmann, A.; Diewok, J.; Schuster, K. C.; Lendl, B. Rapid method for the discrimination of red wine cultivars based on mid-infrared spectroscopy of phenolic wine extracts. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1139-1145.
- [24] Csomòs, E.; Héberger, K.; Simon-Sarkadi, L. Principal component analysis of biogenic amines and polyphenols in hungarian wines. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3768-3774.
- [25] García-Jares, C.; García-Martín, S.; Cela-Torrijos, R. Analysis of some highly volatile compounds of wine by means of purge and cold trapping injector capillary gas chromatography. Application to the differentiation of Rias Baixas Spanish white wines. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 764-768.
- [26] Nieuwoudt, H. H.; Prior, B. A.; Pretorius, I. S.; Manley, M. ; Bauer, F. F. Principal component analysis applied to Fourier transform infrared spectroscopy for the design of calibration sets for glycerol prediction models in wine and for the detection and classification of outlier samples. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3726-3735.
- [27] Blasco, A.J.; Gonzalez-Crevillen, A.; González, M.C.; Escarpa, A. Direct electrochemical sensing and detection of natural antioxidants and antioxidant capacity in vitro systems. Review. *Electroanal.* **2007**, *19*, 2275-2286.
- [28] Miller, J. N.; Rice-Evans, C. A; Factors influencing the antioxidant activity determined by ABTS radical cation assay. *Free Radical Res.* **1997**, *26*, 195-199.

- [29] Fogliano, V.; Verde, V.; Randazzo, G.; Ritieni, A. Method for measuring antioxidant activity and its application to the monitoring the antioxidant capacity of wines. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1035-1040.
- [30] Singleton, V. L.; Rossi, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* **1965**, *16*, 144-158.
- [31] Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **1999**, *299*, 152-178.
- [32] McMurrough, I.; Baert, T. Identification of proanthocyanidins in beer and their direct measurement with a dual electrode electrochemical detector. *J. Inst. Brew.* **1994**, *100*, 409-416.
- [33] Landrault, N.; Poucheret, P.; Ravel, P.; Gasc, F.; Cros, G.; Teissedre P. L. Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3341-3348.
- [34] De Beer, D.; Joubert, E.; Gelderblom, W. C. A.; Manley, M. Antioxidant activity of south african red and white wines: free radical scavenging. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *57*, 902-909.
- [35] Mannino, S.; Brenna, O.; Buratti, S.; Cosio, M. S. A new method for the evaluation of the "Antioxidant power" of wines. *Electroanal.* **1998**, *10*, 908-912.
- [36] Kim, K. R.; Kim, J. H.; Cheong, E.; Jeong, Ch. Gas chromatographic amino acid profiling of wine samples for pattern recognition. *J. Chromatogr. A.* **1996**, *722*, 303-309.
- [37] Nouadje, G.; Simeon, N.; Dedieu, F.; Nertz, M.; Puig, Ph.; Couderc, F. Determination of twenty eight biogenic amines and amino acids during wine aging by micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. A.* **1997**, *765*, 337-343.
- [38] Romero, R.; Sanchez-Vinas, M.; Gazquez, D.; Bagur, M. G. Characterization of selected spanish table wine samples according to their biogenic amine content from liquid chromatographic determination. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4713-4717.
- [39] García-Villar, N.; Hernández-Cassou, S.; Saurina, J. Characterization of wines through the biogenic amine contents using chromatographic techniques and chemometric data analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 7453-7461.
- [40] Saíz-Abajo, M. J.; González-Saíz, J. M.; Pizarro, C. Classification of wine and alcohol vinegar samples based on near-infrared spectroscopy. Feasibility study on

- the detection of adulterated vinegar samples. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7711-7719.
- [41] Pereira, G. E.; Gaudillere, J. P.; Van Leeuwen, C.; Hilbert, G.; Laviolle, O.; Maucourt, M. ¹H NMR and chemometrics to characterize mature grape berries in four wine-growing areas in Bordeaux, France. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6382-6389
- [42] Košir, I.; Kidrič, J. Use of modern nuclear magnetic resonance spectroscopy in wine analysis: determination of minor compounds. *Anal. Chim. Acta.* **2002**, *458*, 77–84.
- [43] Amaral, F. M.; Caro, M. S. B. Investigation of different pre-concentration methods for NMR analyses of brazilian white wine. *Food Chem.* **2005**, *93*, 507–510.
- [44] Weekley, A. J.; Bruins, A. J.; Sisto, M.; Augustine, M. Using NMR to study full intact wine bottles. *J. Magn. Reson.* **2003**, *161*, 91–98.
- [45] Valcárcel Cases, M.; Luque de Castro, M. D. *Análisis por inyección en flujo*. Caja de ahorros y Monte de Piedad de Córdoba. España, **1984**.
- [46] Trojanowicz, M. *Flow injection analysis. Instrumentation and applications*. University of Warsaw & Institute of Nuclear Chemistry & Technology. Polonia, **2000**.
- [47] Ruzicka, J.; Hansen, E. H. *Flow injection analysis*. Wiley-Interscience publication. E.U.A., **1988**.
- [48] B. Karlberg, B.; Pacey, G. E. *Flow injection analysis. A practical guide*. Elsevier. E.U.A., **1989**.
- [49] Alegret, S.; Alonso, J.; Bartrolí, J.; Machado, A. A. S. C.; Lima, J. L. F. C.; Paulis, J. M. Construction of equipment for potentiometric determinations in flow injection analysis. *Quim. Anal.* **1987**, *6*, 278-292
- [50] Nevin, A.; Osticioli, I.; Anglos, D.; Burnstock, A.; Cather, S.; Castellucci, E. Raman spectra of proteinaceous materials used in paintings: a multivariate analytical approach for classification and identification. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 6143-6151.
- [51] Blanco, M.; Cerda, V. *Quimiometría*. A.E.T.S. Publicacions de la Universitat Autònoma de Barcelona. España, **1988**.
- [52] Miller, J. N. ; Miller, J.C. *Estadística y quimiometría para química analítica*. Pearson, España, **2002**.
- [53] Jolliffe I. T. *Principal Component Analysis*. Springer-Verlag. E.U.A., **2002**.
- [54] Rodríguez, J. A.; Barrado, E.; Castrillejo, Y.; Santos, J. R.; Lima, J. L. F. C. Validation of a tubular bismuth film amperometric detector. Determination of

- diclofenac sodium by multisyringe flow injection analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *45*, 57-53.
- [55] Ozyurt, D.; Demirata, B.; Apak R. Determination of total antioxidant capacity by a new spectrophotometric method based on Ce (IV) reducing capacity measurement. *Talanta.* **2006**, *71*, 1155-1165.
- [56] Malysko, J.; Karbarz, M. Electrochemical oxidation of Trolox and α -tocopherol in acetic acid. A comparative study. *J. Electroanal. Chem.* **2006**, *595*, 136-144.
- [57] Bosque-Sendra, J. M.; Gámiz-Gracia, L.; García-Campaña A. M. An overview of qualimetric strategies for optimisation and calibration in pharmaceutical analysis using flow injection techniques. *Anal. Bional. Chem.* **2003**, *377*, 863-874