

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



**“DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y
SULFITOS EN VINOS DE FRUTAS”**

MONOGRÁFIA
PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUÍMICA

PRESENTADO POR:

Bra. WALESKA MERCEDES REYES CARVAJAL
Br. FANOR ERNESTO NARVÁEZ JUÁREZ

TUTOR:
Dr. SERGIO LÓPEZ GRÍO

LEÓN, DICIEMBRE DE 2011

DEDICATORIA

"A Dios nuestro Señor"

AGRADECIMIENTOS

A Dios nuestro Señor por darnos la fortaleza y la sabiduría para concluir con éxitos nuestros estudios universitarios.

A nuestras queridas familias por brindarnos siempre su inmenso soporte y su infinito amor, por la comprensión en el cansancio y nuestro mal humor en los desvelos, por las largas horas de ausencia comprendida y la sonrisa en sus rostros al vernos llegar a casa.

A nuestro tutor MSC Sergio López Grío por haber aceptado el reto de guiarnos al desarrollo de nuestro trabajo, demostrando su paciencia y preocupación con nosotros.

A nuestros maestros, por siempre apoyarnos en el camino de nuestra formación y compartir sus valiosos conocimientos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. RESUMEN	1
II. OBJETIVOS	2
III. MARCO TEÓRICO	3
III.1 La Flor de Jamaica	3
III.1.1 Origen de La Flor de Jamaica	3
III. 1.1 Beneficios del consumo de La Flor de Jamaica	4
III.1 Usos y Aplicaciones de La Flor de Jamaica	4
III.2 Vinos	5
III.2.1 Definición	5
III.2.2 Clasificación de Los Vinos	6
III.2.2.1 Clasificación por su contenido en azúcares	6
III.2.2.2 Clasificación por su edad	7
III.2.2.3 Clasificación por su color	7
III.2.2.4 Clasificación por vinificación	8
III.3 Fermentación	9
III.3.1 Concepto	9
III.3.2 Descripción del equipo de fermentación	10
III.3.3 Fermentación Alcohólica	10
III.3.3.1 Tipos de Fermentación Alcohólica	11
III.3.3.2 Fermentación Maloláctica	12

INDICE DE CONTENIDOS

III.4 Técnicas de Separación	12
III.5 Cromatografía en papel	14
III.5.1 Concepto	14
III.5.2 Método	15
III.5.3 Tipos	15
III.6 Ácidos del vino	16
III.6.1 Ácido Málico	16
III.6.1.1 Usos del ácido málico	17
III.6.2 Ácido Láctico	18
III.6.3 Ácido tartárico	18
III.6.4 Ácido succínico	19
III.7 Volumetría	19
III.8 Los sulfitos y su importancia	21
III.8.1 Determinación de anhídrido sulfuroso	21
III.9 Tratamiento de los datos	22
III.9.1 Ensayos de comparación de varias varianzas	22
III.9.2 Prueba de Bartlett	23
III.9.3 ANOVA	24
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	26
IV.1 Equipos	26
IV.2 Materiales	26

INDICE DE CONTENIDOS

IV.3 Reactivos	27
IV.4 Soluciones	28
IV.5 Metodología	30
IV.5.1 Preparación de la muestra.....	30
IV.5.2 Estandarización de la disolución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1 N.....	31
IV.5.3 Valoración de la disolución de I_2 0.1 N.....	32
IV.5.4 Determinación de anhídrido sulfuroso total	33
IV.5.5 Determinación del anhídrido sulfuroso libre	34
IV.5.6 Identificación de ácidos orgánicos en vinos	35
V. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	36
V.1 Optimización de separación cromatográfica de ácidos orgánicos.....	36
V.1.1 Selección de material cromatográfico.....	36
V.1.2 Selección de fase móvil eluyente	37
V.1.3 Factores de retención de los ácidos orgánicos.....	39
V.1.4 Identificación de ácidos orgánicos en muestras de vino de frutas.....	40
V.2 Determinación de sulfito total y libre	42
V.2.1 Comparación de los resultados de sulfitos	44
VI. CONCLUSIONES	48
V.II RECOMENDACIONES	49
V.III. BIBLIOGRAFÍA.....	50

I. RESUMEN

El presente trabajo monográfico, es una primera experiencia del Laboratorio de Técnicas de Separación en la determinación de algunos parámetros físico-químicos relacionados con vinos de frutas, tanto de elaboración artesanal propia como de otras elaboraciones. Para esto se ensayaron técnicas de cromatografía en papel y volumetría para identificar ácidos orgánicos y contenidos de sulfito total y libre en las muestras objeto de este estudio. Se identificaron de esta forma los ácidos orgánicos málico, láctico, tartárico y succínico en tres muestras de vino, dos de Flor de Jamaica (Mi vino y Chinantlan) y uno de uvas (Rey de Copas), el que se utilizó como referencia respecto a los otros vinos estudiados. La separación cromatográfica llevada a cabo, se realizó utilizando placas de papel de filtro y una fase eluyente de n-butanol y ácido acético al 50% conteniendo azul de bromofenol, se determinaron así los factores de retención y se compararon con los de estándares de estos ácidos para confirmar la presencia de estos ácidos en las muestras de vino. La cuantificación volumétrica de los sulfitos totales y libres se llevó a cabo empleando disoluciones estandarizadas de yodo y almidón como indicador del punto final de valoración. Finalmente se comparó estadísticamente los contenidos de sulfito libre y total en las muestras de vino estudiadas utilizando para esto pruebas estadísticas de contraste como Bartlett, Fisher, ANOVA y comparación de medias de muestras apareadas. Los resultados obtenidos tanto en la identificación de ácidos orgánicos como en la determinación de sulfitos, demuestran la aplicabilidad del trabajo presentado, el que podría ser de utilidad para empresas artesanales de elaboración de vinos de frutas en la región del occidente del país.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Determinar ácidos orgánicos y sulfitos en muestras de vinos de frutas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Optimizar las condiciones de separación cromatográfica de estándares de ácidos orgánicos.
2. Identificar ácidos orgánicos en muestras de vino por cromatografía de papel.
3. Determinar la cantidad de sulfito libre y total en muestras de vino.
4. Comparar estadísticamente los contenidos de sulfito libre y total en las muestras de vino estudiadas.

III.MARCO TEÓRICO

III.1. LA FLOR DE JAMAICA

III.1.1 ORIGEN DE LA FLOR DE JAMAICA

La planta de Jamaica (Hibiscus sabdariffa) es un arbusto anual nativo de África e intensamente cultivado en las regiones tropicales y subtropicales de la India, Tailandia, Senegal, Egipto, Estados Unidos, Panamá y México. Esta planta se conoce por diferentes nombres nativos o locales, tales como Karkade, roselle, sorrel, Guinea sorrel, rosa de Jamaica, flor de Jamaica, Jamaica, agrio de Guinea, quetmia ácida y viña, por sólo mencionar algunos. Existen diferentes variedades como la Jerzy, la Sudan y la Brown. Se le cultiva principalmente por sus hojas, cálices carnosos, semillas y fibra; sin embargo, el mayor interés comercial se centra en su flor debido a su potencial farmacéutico y alimenticio. Su uso es como alimento o como un colorante que sustituye a los sintéticos.



de longitud.

La Jamaica es una planta arbustiva de crecimiento anual, que mide aproximadamente 2.5 metros de altura; su tallo es rojo, cilíndrico, liso y suave. Sus hojas son verdes y se observan en ellas venas de color rojo que pueden ser largas o cortas, crecen de manera alterna y miden de 7.5 a 12.5 centímetros

Las hojas de la parte baja pueden contener de tres a siete lóbulos con márgenes dentados. Las flores aparecen individualmente en las axilas de las hojas y miden aproximadamente 12.5 centímetros de ancho; son amarillas, con un centro de color rosa a marrón, y cambian a rosado al final del día, cuando se marchitan. [1,2]

III.1.2 BENEFICIOS DEL CONSUMO DE LA FLOR DE JAMAICA

Diversas culturas han hecho uso extenso de la herbolaria y de alimentos a los que se ha reconocido como terapéuticos o beneficiosos para la salud. Existen algunos alimentos que particularmente se reconocen por sus aportes a la salud.

Éstos se denominan funcionales o nutracéuticos, y han sido definidos como alimentos que proporcionan un beneficio probado científicamente a la salud humana.

[1]

III.1.3 USOS Y APLICACIONES DE LA FLOR DE JAMAICA

Los extractos de las flores de Jamaica se emplean como colorantes naturales para los alimentos, en emulsiones para las bebidas y en la preparación de mermeladas y gelatinas de color rojo brillante y placentero con un sabor ácido. La cocción de las flores también se usa como un sustituto del té o el café por personas que sufren de problemas de salud. Se le recomienda en la terapia del corazón, enfermedades de los nervios, presión sanguínea alta, fiebre, enfermedades hepáticas y calcificación de las arterias. [2]

La Jamaica, por su fibra y cálices, se emplea asimismo en la manufactura de cordajes y canastas, así como en la preparación de bebidas refrescantes. Las propiedades nutricionales del aceite y la semilla hacen que sea una fuente invaluable de alimento debido a su contenido proteico y calórico (33% proteína, 24% carbohidratos y 22% de grasa en base de peso seco) y sustanciales cantidades de fibra (14% de peso seco como fibra) y considerables micronutrientes. Las flores contienen altos niveles de minerales, tales como hierro (88 mg/100 g), magnesio (442 mg/100 g), calcio (1.28%) y selenio (0.09 mg/Kg). La semilla constituye una fuente excelente de aceite de cocina. Los tallos tiernos, hojas y cálices se usan en la preparación de sopas y salsas. Los cálices se ocupan en preparados que se consumen como sustitutos de la carne.

Las flores y frutos carnosos se utilizan en infusiones farmacéuticas para aliviar los síntomas de bronquitis y tos. Las investigaciones con los extractos de la Jamaica demuestran que estos podrían actuar como antioxidantes y contribuir a las acciones anticancerígenas o cardioprotectivas.

MARCO TEÓRICO

La dieta parece desempeñar un papel importante en el desarrollo de muchas enfermedades, especialmente las relacionadas con los trastornos cardiovasculares y el cáncer, las cuales se consideran asociadas con el estrés oxidativo.

III.2 VINOS

III.2.1 DEFINICIÓN



El vino es una bebida alcohólica elaborada por fermentación del jugo, fresco o concentrado, de uvas. Su nombre proviene de la variedad 'Vitis Vinifera' que es la variedad de uva de la que descienden la mayoría de las utilizadas para la elaboración de vinos, y las primeras en ser

utilizadas para ello. [3,4,5,6]

Para la producción del vino, las uvas recién recogidas son prensadas para que liberen su mosto o jugo, que es rico en azúcares. Luego de esto, las levaduras transportadas por el aire, o la adición de levaduras seleccionadas al mosto, provocan la fermentación de éste, resultando como principales productos de la fermentación el alcohol etílico y el dióxido de carbono. Este último, liberado en forma de gas.

La fermentación se interrumpe normalmente cuando todos los azúcares fermentables han sido transformados en alcohol y dióxido de carbono, o cuando la concentración del primero supera la tolerancia de las levaduras. Para ese momento, lo que era mosto, se ha transformado en vino. La graduación de los vinos varía entre un 7 y un 16% de alcohol por volumen, aunque la mayoría de los vinos embotellados oscilan entre 10 y 14 grados. [5]

El azúcar y los ácidos que posee la fruta *Vitis vinifera* hace que sean suficientes para el desarrollo de la fermentación. No obstante el vino es una suma de un conjunto de factores ambientales: clima, latitud, altura, horas de luz, etc.

MARCO TEÓRICO

Aproximadamente un 66% de la recolección mundial de la uva se dedica a la producción vinícola, el resto es para su consumo como fruta. A pesar de ello el cultivo de la vid cubre tan sólo un 0.5% del suelo cultivable en el mundo. El cultivo de la vid se ha asociado a lugares con un clima mediterráneo. [4]

III.2.2 CLASIFICACIÓN DE LOS VINOS

Los vinos pueden ser clasificados por diversas características. Las principales clasificaciones son:

- a) Por su contenido en azúcares
- b) Por su edad
- c) Por su color
- d) Por vinificación

III.2.2.1 CLASIFICACIÓN POR SU CONTENIDO EN AZÚCARES

El contenido en azúcares del vino determina su encuadramiento. Es usual en vinos generosos y espumosos En la tabla III.2.2.1 muestra [4,6].

Desde g/l	Hasta g/l	Tipo de Vino
00	05	Secos
15	30	Abocados
05	15	Semi-Secos
30	50	Semi-Dulces
50	Adelante	Dulces

III.2.2.2 CLASIFICACIÓN POR SU EDAD

- a) **Vino Joven:** También conocidos como “vinos del año”, suelen ser frescos y afrutados y no se benefician de la crianza, ya que pueden perder el encanto de su fruta, sin duda son los más populares y a la vez los más económicos. [4,6]
- b) **Vino de Crianza:** Los vinos españoles criados en barricas son hoy en día alabados por los entendidos en vino de todo el mundo. Criados en barricas de Roble (francés o americano -la madera tiene distinto nivel de porosidad-) deben haber envejecido en madera al menos durante seis meses y tener como mínimo dos años. Siendo esta la regla general, estos parámetros son regulados por cada ente regulador de las diferentes denominaciones de origen. A los crianzas Rosados y Blancos se les exige haber envejecido en madera durante un mínimo de seis meses.
- c) **Vinos Reserva:** A estos vinos se les requiere un mínimo de tres años de maduración en la bodega, incluyendo al menos un año de crianza en barrica de roble.
- d) **Gran Reserva:** Estos grandes vinos sólo se producen los mejores años y no pueden ser vendidos hasta el sexto año, con un mínimo de dos años en barrica de roble y un mínimo de tres en botella. Como consumidor, cuanto menor es el tiempo de crianza en barrica, menos tiempo pueden guardarse los vinos.

III.2.2.3 CLASIFICACIÓN POR SU COLOR

Otra clasificación de los vinos es a través de sus colores, a saber tintos (*rouge - red*), blancos (*blanc - white*) y rosados (*rosé - pink*)[3,4,5,6].

- a) **Vinos Tintos:** El color del vino proviene del color de la piel de la uva, donde el mosto es dejado en contacto con la piel de la uva hasta que se alcance un color deseado. Para hacer vino tinto, las uvas rojas se aplastan y el mosto pasa parte o la totalidad del periodo de fermentación y, en muchos casos, un periodo de maceración previo o posterior a la fermentación, en contacto con las pieles u hollejos. Toda la materia colorante, además de múltiples compuestos saborizantes y taninos, se encuentran en los hollejos de las uvas y la fermentación y maceración se encargan de liberarlos. Esta liberación se intensifica a menudo por técnicas de activación mecánica (remontado), o batido (bazuqueado), durante estos periodos.

MARCO TEÓRICO

- b) **Vinos Blancos:** Los vinos blancos son aquellos producidos a partir de uvas verdes o blancas; o bien a partir de uvas negras aunque en estos casos nunca se deja al mosto en contacto con la piel de las uvas. El color obtenido en los vinos blancos es de tono verdoso o amarillento.
- c) **Vinos Rosados** El rosado (*rosé*) es producido dejando el mosto en contacto por un tiempo breve con la piel de las uvas. Suele producirse utilizando uvas rojas que permanecen en contacto con los hollejos (piel de la uva) por breves períodos. Con menor frecuencia se produce mezclando vinos tintos y blancos.

III.2.2.4 CLASIFICACIÓN POR VINIFICACIÓN

Una clasificación primaria es aquella que los divide como: [3,5]

- a) Vinos calmos o Naturales
- b) Vinos fuertes o fortificados
- c) Vinos espumantes

Esta clasificación se basa en la técnica de producción llamada vinificación.

- a) **Vinos calmos o naturales:** Son aquellos que se hacen desde el mosto, y que es fermentado en forma natural, o con algún aditivo en cantidades controladas como levaduras, azúcar o cantidades muy pequeñas de sulfuros. Estos vinos son de una graduación alcohólica que va desde el 10% al 15%, ya que se les detiene la fermentación alcanzando estos valores. Son los habitualmente conocidos como blancos, tintos y rosados.
- b) **Vinos fortificados o fuertes:** Reciben alguna dosis de alcohol, usualmente un brandy de uvas, en alguna etapa de su vinificación. Las interferencias controladas tipifican la producción y características de los vinos fuertes resultando el Vermouth, Jerez, Marsala, Madeira y Oporto. El contenido alcohólico de estas variedades va desde los 16° a los 23° (grados por volumen).
- c) **Vinos espumantes:** Son aquellos del tipo del Champagne, los cuales tienen dos fermentaciones. La primera que es la habitual del vino natural, y una segunda que tiene lugar en la botella.

MARCO TEÓRICO

Algunos vinos naturales tienen cierta efervescencia llamada *pétillance*, pero esta es muy suave y no es causada como resultado de interferencias en el proceso de fermentación.

Si se trata de vino espumoso, este se elabora según distintos métodos, siendo el más barato el de carbonatación forzada usando dióxido de carbono.

Los de calidad son aquellos que no cuentan con aditivos y su segunda fermentación es alcanzada por añejamiento. En todos los casos los vinos espumantes presentan cierta sedimentación, donde los de calidad son de-sedimentados utilizando distintas técnicas que pueden incluir auxilios mecánicos y reapertura de las botellas, previo a su comercialización.

III.3. FERMENTACIÓN

III.3.1 CONCEPTO

La fermentación es un proceso que realizan muchos microorganismos, efectuando reacciones sobre algunos compuestos orgánicos y liberando energía. Hay muchos tipos diferentes de fermentación, pero en condiciones fermentativas solamente se efectúa una oxidación parcial de los átomos de carbono del compuesto orgánico y, por consiguiente, sólo una pequeña cantidad de la energía potencial disponible se libera. [7]

III.3.2 DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO DE FERMENTACIÓN



El fermentador es una cuba con tapa, en acero inoxidable, la cual está recubierta por una chaqueta en acero inoxidable, por la cual circula vapor de agua cuando es necesario calentar la solución que contiene la cuba, si por el contrario, es necesario enfriar, tiene una llave que permite el paso de agua fría. Además, la cuba está provista de un desagüe, para cuando se desee lavar o desocuparla. Para evitar fugas, dicho desagüe es sellado con un tapón de caucho.

III.3.3 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La fermentación alcohólica denominada también como fermentación del etanol o incluso fermentación etílica es un proceso biológico de fermentación en plena ausencia de aire, originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono para obtener como productos finales: un alcohol en forma de etanol, dióxido de carbono (CO_2) en forma de gas. [8,]

El etanol resultante se emplea en la elaboración de algunas bebidas alcohólicas, tales como el vino, la cerveza, la sidra, el cava. Aunque en la actualidad se empieza a sintetizar también etanol mediante la fermentación a nivel industrial a gran escala para ser empleado como biocombustible.

El final del proceso fermentativo es cuando ya se han desdoblado prácticamente todos los azúcares y cesa la ebullición. Una vez finalizada la fermentación alcohólica ya tenemos el vino nuevo, que tras un periodo de algunos meses termina de fermentar los pocos azúcares que siempre quedan tras la fermentación principal. Finalmente se termina de hacer este vino nuevo con el desarrollo de una segunda fermentación: la fermentación maloláctica. [9]

III.3.3.1 TIPOS DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

3.3.3.1.1 Fermentación Industrial.

La fermentación etílica ha sufrido algunas transformaciones con el objeto de aumentar la eficiencia química del proceso. Una de las mejoras más estudiadas en la industria es la posibilidad de realizar la fermentación alcohólica continua con el objeto de obtener mayores cantidades de etanol. [8]

Hoy en día el procesamiento industrial de algunas bebidas alcohólicas como puede ser el vino o la cerveza se realizan en ambientes controlados capaces de ofrecer a un ritmo apropiado de estos productos de consumo al mercado. Los métodos de fermentación continua se empezaron a patentar en la década de los 1950s y desde entonces han hecho que la industria de las bebidas alcohólicas haya experimentado un crecimiento apreciable. Una de las características de la fermentación etílica industrial es la selección adecuada de las levaduras a inocular en el proceso de fermentación con el objeto de aumentar el rendimiento de la producción.

La fermentación industrial típica es esencialmente un proceso que se produce en un recipiente llamado fermentador o en general, biorreactor, mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo (levaduras) son transformadas mediante la reacción microbiana en metabolitos y biomasa. Estos contenedores son herméticos y permiten retirar mediante canalizaciones apropiadas el dióxido de carbono resultante. Durante el proceso los microorganismos van aumentando de concentración en el transcurso de la reacción al mismo tiempo que el medio va modificando sus propiedades químicas y se forman productos nuevos como consecuencia de las reacciones anabólicas.

3.3.3.1.2 Fermentaciones Naturales

La fermentación alcohólica con la emisión de ciertas cantidades de etanol se produce de forma espontánea en la naturaleza siempre que se encuentre un azúcar y una atmósfera pobre de oxígeno, es por esta razón que ocurre espontáneamente en el interior de algunas frutas que se puede decir sufren un proceso de maduración anaeróbica, tal y como puede ser el melón curado que muestra olor a alcohol, o los mismos cocos.

MARCO TEÓRICO

Un aspecto de la fermentación alcohólica natural o espontánea se puede dar en ciertas frutas como el de la vid, en una fase inicial en la que las uvas se incluyen en las *cubas madre* de acero inoxidable y se produce la denominada *fermentación tumultuosa* encargada de hacer aparecer las primeras trazas de etanol.

III.3.2 FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA

La fermentación maloláctica es un proceso desencadenado por bacterias lácticas. Esta reacción produce exclusivamente ácido láctico. El dióxido de carbono se desprende en forma de gas creando una efervescencia en el vino. Un gran número de bacterias pueden llevar a cabo este proceso. [10]

Las bacterias malolácticas no solo transforman el ácido málico en ácido láctico, sino que al mismo tiempo contribuyen a la formación de componentes aromáticos positivos para el vino. Además de resaltar la suavidad permite reducir las sensaciones herbáceas y vegetales, de incrementar las notas afrutadas de los vinos tintos.

Esta fermentación reduce la acidez total del vino al perderse parte de la acidez fija: una parte de la acidez del vino se transforma en gas carbónico, el cual se desprende y desaparece. La fermentación del ácido málico está provocada por el desarrollo de bacterias lácticas que se encuentran en los hollejos de las uvas maduras.

III.4 TÉCNICAS DE SEPARACIÓN

Las técnicas analíticas más empleadas en la actualidad pueden englobarse en dos grandes grupos: técnicas de separación y técnicas espectroscópicas. Las técnicas espectroscópicas proporcionan, para cada compuesto analizado, una información compleja, relacionada con sus características estructurales específicas, por otro lado las técnicas de separación se utilizan para resolver los componentes de una mezcla y la señal obtenida puede utilizarse con fines analíticos cuantitativos o cualitativos. [11]

MARCO TEÓRICO

Actualmente las separaciones analíticas se realizan fundamentalmente por cromatografía y electroforesis. La cromatografía comprende un conjunto importante y diverso de métodos que permite separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios. Se pueden separar moléculas en función de sus cargas, tamaños y masas moleculares. También a través de la polaridad de sus enlaces, sus potenciales redox, etc.

La cromatografía no solo permite la separación de los componentes de una mezcla, sino también su identificación y cuantificación. El análisis cualitativo está basado en la medida de parámetros cromatográficos (tiempos y volúmenes de retención) mientras que el análisis cuantitativo está basado en la medida de alturas o áreas de picos cromatográficos que se relacionan con la concentración. La columna cromatográfica y la forma con la que se diseña, constituye el corazón de la separación.

El detector, situado al final de la columna es el que garantiza la respuesta de los componentes que se separan. En todas las separaciones cromatográficas la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. La fase móvil puede pasarse a través de una fase estacionaria, con la que es inmisible y que se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

Aquellos componentes que son fuertemente retenidos, por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente. Estos resultados se recogen en forma de gráficos llamados cromatogramas.

MARCO TEÓRICO

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar según la forma en que la fase móvil y la fase estacionaria se pongan en contacto. Así en la cromatografía de columna, un tubo estrecho contiene la fase estacionaria a través de la cual se hace pasar la fase móvil por presión. En la cromatografía en plano, la fase estacionaria se fija sobre una placa plana o a los intersticios de un papel; en este caso la fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por capilaridad o por gravedad.

Las tres clases de cromatografía desde un ángulo más general son cromatografía de líquidos, cromatografía de gases y cromatografía de fluidos supercríticos. Como su nombre lo indica, la fase móvil en las tres técnicas son líquido, gas y fluido supercrítico respectivamente. Solo la cromatografía de líquidos es la que puede llevarse a cabo en columna o sobre superficies planas, por otra parte tanto la de gas como la de fluidos supercríticos están restringidas a los procedimientos en columna de tal manera que las paredes de la columna contienen la fase móvil.

La técnica más usada es la cromatografía líquida de alta resolución, HPLC por su sensibilidad, fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y su aplicación a sustancias de primordial interés en la industria, como son los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, entre otros.

III.5 CROMATOGRAFÍA EN PAPEL

III.5.1 CONCEPTO

La cromatografía en papel es la técnica de separación e identificación de sustancias químicas en la cual la fase estacionaria es el agua absorbida y adsorbida que hay en el papel y el soporte es el mismo papel. La fase móvil es una solución que consiste en un disolvente o de una mezcla de varios líquidos que contiene agua.

La fase móvil es la que provoca un movimiento de las distintas especies para que abandonen el medio soporte (papel), y la fase estacionaria la que suministra el efecto retardador, selectivo para cada componente, que condiciona que cada uno de ellos se desplace con distinta velocidad. [12]

MARCO TEÓRICO

La movilidad de los componentes de la mezcla a separar depende de la afinidad química o propiedades similares entre estos componentes y cada una de las fases del sistema cromatográfico. Si uno de los componentes de la mezcla presenta propiedades químicas muy similares a la fase móvil tendrá gran movilidad, es decir, el efecto de retención que provocaría la fase estacionaria sería nulo.

Lo contrario sucedería con un componente de la mezcla que tenga una gran afinidad con la fase estacionaria. Por lo tanto, la técnica se basa en la velocidad de desplazamiento diferencial de los solutos al ser arrastrados por una fase móvil sobre una estacionaria. Esta diferencia será la que nos permita identificar cuantos componentes tiene una disolución y cómo separarlos.

III.5.2 MÉTODO

Sobre el papel filtro se seca una gota de extracto de la muestra. Para evitar evaporación se cuelga el papel dentro de una cámara cromatográfica en forma tal que la mancha pueda ser irrigada con la fase móvil, tanto hacia abajo por gravedad, hacia arriba u horizontalmente por capilaridad. Cuando la fase móvil ha saturado el papel hasta una distancia predeterminada para lograr la separación, se saca el papel de la cámara. [12]

III.5.3 TIPOS

El Descendente se trata de una caja saturada de vapor de agua, atravesada por una cajetín semicilíndrico lleno con el solvente orgánico. Para sujetar el papel introducimos una varilla a lo largo de la caja. El solvente comenzará ascendiendo por el papel por capilaridad y continuará bajando al salir de la cajetilla, pasando por la zona de muestra y arrastrándola, consiguiéndose así la separación.

El Ascendente, el solvente se encuentra en la parte inferior de la cubeta y asciende por el papel haciendo que se separe la muestra. La resolución de la cromatografía en papel descentente es mayor. [13]

III.6 ÁCIDOS DEL VINO

El vino es una bebida ácida por naturaleza, el zumo de cualquier fruta sin madurar en exceso lo es. . Puede parecer que los ácidos no deban conferir cualidades particularmente beneficiosas al vino, pero si tienen que estar y parece claro que forman parte esencial de un vino, como el agua, el alcohol, mejor que estén en su justa medida. [14]

Podríamos clasificar los ácidos de un vino en tres categorías básicas:

1. Ácidos orgánicos naturales: Son aquellos que proceden de la uva y por tanto se han formado durante el proceso madurativo natural en la planta. Son por tanto ácidos que encontraremos generalizados en el mundo de la fruta. En esta categoría destacamos al ácido tartárico, el ácido málico y el ácido cítrico.
2. Ácidos orgánicos derivados. Son aquellos surgidos durante los procesos fermentativos a los que es sometido el mosto. Aquí nos encontramos fundamentalmente con el láctico, el ácido succínico y el ácido acético.
3. Ácidos inorgánicos. Su origen es mineral y entre ellos destaca el ácido sulfúrico, presente en forma de sulfatos.

III.6.1 ÁCIDO MÁLICO

El ácido málico es un ácido orgánico de sabor duro que se encuentra en algunas frutas y verduras con sabor ácido, especialmente en las manzanas, en el mosto y a veces también en el vino, sobre todo si procede de uvas con maduración incompleta. Es atacado por las bacterias lácteas que lo transforman en ácido láctico, mucho más suave, durante la fermentación maloláctica. [14,15,17]

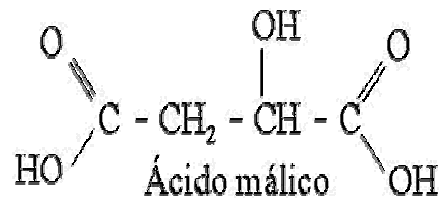
El nombre procede del latín *Malus domestica* que significa manzana y es uno de los ácidos más abundantes de la naturaleza y el más fácilmente atacado por los microorganismos.

Este ácido se obtiene comercialmente por síntesis química. Se puede obtener de forma sintética a partir del ácido tartárico y del ácido succínico. Se utiliza como aditivo alimentario por su acción antibacteriana y su agradable aroma. También se emplea en medicina, en la fabricación de ciertos laxantes y para tratar afecciones de garganta.

MARCO TEÓRICO

El ácido málico se encuentra en algunas frutas y verduras con sabor ácido como los membrillos, las uvas (El ácido málico tiene concentraciones en la uva desde 1 hasta 4 g/l y es el responsable del sabor verde y ácido de las mismas), manzanas (el sabor ácido en la punta de la lengua proviene de la presencia de este ácido) y las cerezas no maduras. En las verduras se encuentra en cierta cantidad en los pecíolos del ruibarbo pero principalmente en las manzanas; por este motivo, el ácido málico se conoce también como “ácido de las manzanas”.

Se encuentra en las uvas verdes y en vinos que no han realizado totalmente la fermentación maloláctica. La presencia de ácido málico se identifica por un peculiar olor en el vino, que recuerda al olor de las manzanas verdes.



III.6.1.1 USOS DEL ÁCIDO MÁLICO

Es un ácido orgánico y puede usarse para producir corriente eléctrica mediante la fermentación maloláctica en un proceso es muy similar a una pila biológica. Se emplea en la industria farmacéutica en la fabricación de laxantes así como en medicamentos indicados sobre el aparato respiratorio. Es utilizado como ácido, saborizante y estabilizante de color en los jugos o zumos de manzana y de uva. [17]

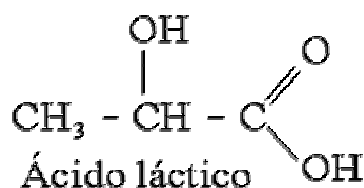
En la elaboración de vinos una vez terminada la fermentación alcohólica se realiza una segunda transformación denominada fermentación maloláctica, producida por bacterias que transforman el ácido málico en ácido láctico (bajando la acidez fija del vino), al tiempo que los polifenoles tienden a polimerizarse entre sí disminuyendo su reactividad. Todo esto quiere decir que el vino pierde acidez, y gana en suavidad y aroma.

III.6.2 ÁCIDO LÁCTICO

El ácido láctico puede surgir bien en la fermentación alcohólica o bien en la maloláctica, cuando ésta última se produce. La transformación del málico en láctico supone una reducción de la acidez total del vino y un aumento de su estabilidad biológica [14,15,16,19].

El ácido láctico es un acidificante para corregir la acidez en mostos y vinos. Las características son las siguientes [18]:

- Rinde de manera más eficaz en el incremento de la acidez total, debido a la mayor solubilidad de sus sales con el potasio.
- Su adición provoca una ligera caída del pH, aunque menor que mediante la utilización de ácido tartárico y siempre predecible.
- Confiere a los vinos una estabilidad química y microbiológica, además de una mejora de sus cualidades organolépticas (aporta sensaciones de redondez y suavidad, contribuyendo al equilibrio gustativo del vino).
- Como consecuencia de la ausencia de precipitados, los vinos presentan una capacidad tampón mayor.
- El ácido láctico adicionado en mostos y vinos se mantiene después de la estabilización por frío, pudiendo incluso adicionarse momentos previos al embotellado, sin producir problemas de precipitación en botella.



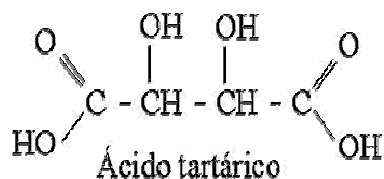
III.6.3 ÁCIDO TARTÁRICO

El ácido tartárico es el más abundante en el vino y también el más estable, pudiendo llegar a suponer más de dos tercios del total. Su aportación al vino es la de añadir características de fruta madura, sabores frescos y agradables, lo que se conoce como notas "vinosas".

MARCO TEÓRICO

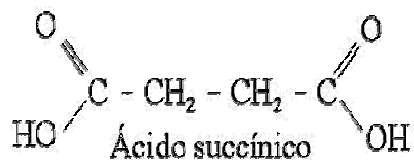
El ácido tartárico precipita de manera natural en forma de sales (tartrato cálcico o bitartrato potásico) como consecuencia de la acción insolubilizante conjunta del alcohol y el frío, formando los famosos cristales o posos del vino [14,16].

En el caso del ácido tartárico el vino se vuelve insípido adquiriendo al mismo tiempo un color apagado, fenómeno que se conoce con el nombre de enfermedad de la vuelta. [15,19]



III.6.4 ÁCIDO SUCCÍNICO

El ácido succínico puede ser encontrado en la fermentación del vino y proviene de la transformación de los azúcares en la fermentación alcohólica y la cantidad producida no evoluciona a lo largo del proceso de conservación del vino. Aporta a los vinos una mezcla de sabores ácidos, salados y amargos [14,15,16,19,20].



III.7 VOLUMETRIA

Es un método volumétrico para medir la cantidad de una disolución se necesita para reaccionar exactamente con otra disolución de concentración y volumen conocidos. Para ello se va añadiendo gota a gota la disolución desconocida o 'problema' a la otra disolución (disolución valorada) desde un recipiente cilíndrico denominado bureta, hasta que la reacción finaliza. Según el tipo de reacción que se produzca, la volumetría será, por ejemplo, volumetría ácido-base, de oxidación-reducción o de precipitación.

MARCO TEÓRICO

El final de la reacción suele determinarse a partir del cambio de color de un indicador, como papel de tornasol o una mezcla especial de indicadores denominada indicador universal. Si se prepara una cantidad de ácido o base con una concentración conocida, se puede medir cuánta cantidad de la otra disolución se necesita para completar la reacción de neutralización, y a partir de ello determinar la concentración de dicha disolución.

Para determinar cuánto ion cloruro hay en una disolución se emplea una disolución de nitrato de plata de concentración conocida. Cuando la reacción se completa se forma cloruro de plata insoluble, que aparece en el fondo del líquido como un precipitado blanco. [21]

Las valoraciones se clasifican por el tipo de objeto a analizar: [22]

1. Valoraciones ácido-base: basadas en la reacción de neutralización entre el analito y una disolución de ácido o base que sirve de referencia. Para determinar el punto final, usan un indicador de pH, un pH-metro, o un medidor de conductancia.
2. Valoraciones redox: basadas en la reacción de oxidación-reducción o reacción redox entre el analito y una disolución de oxidante o reductor que sirve de referencia. Para determinar el punto final, usan un potenciómetro o un indicador redox aunque a veces o bien la sustancia a analizar o la disolución estándar de referencia tienen un color suficientemente intenso para que no sea necesario un indicador adicional.
3. Valoraciones de formación de complejos o complexometrías: basadas en la reacción de formación de un complejo entre el analito y la sustancia valorante. El agente quelante EDTA es muy usado para titular iones metálicos en disolución. Estas valoraciones generalmente requieren indicadores especializados que forman complejos más débiles con el analito.
4. Valoraciones de precipitación: Son aquellas basadas en las reacciones de precipitación. Uno de los tipos más habituales son las Argentometrías: precipitación de aniones como los halógenos (F⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻).

III.8 LOS SULFITOS Y SU IMPORTANCIA

Los sulfitos o anhídrido sulfuroso se encuentran de forma natural en el vino en bajos niveles, pero posteriormente suelen añadir más para una mejor conservación del vino. Un exceso de sulfitos en el vino también empeora su calidad, pierde color, toma un olor picante y altera su sabor, por esta razón se puede confiar en que no administrarán más de lo necesario, pues el vino perdería cualidades. Para saber la cantidad que deben aplicar, primero medirán el sulfuroso que de forma natural ya se encuentra en el vino. [23]

Los sulfitos tienen un efecto conservante y/o antioxidante, que inhibe la formación de bacterias, mohos y levaduras; debido a estas características que les son propias, los sulfitos se utilizan frecuentemente en el vino, en la cerveza, en la conservación de crustáceos, en los preparados a base de hortalizas y de frutas, en las mermeladas en conserva, en las galletas, en las frutas sancochadas y en numerosos otros alimentos. [24]

III.8.1 DETERMINACIÓN DE ANHÍDRIDO SULFUROSO

La determinación de anhídrido sulfuroso en vino se puede realizar por distintos métodos: volumétricos, fotométricos, cromatográficos y enzimáticos, siendo el método volumétrico el que más se ha empleado. El método consiste en una valoración de óxido-reducción con I_2 como reactivo en medio ácido y en presencia de almidón como indicador. [25]

III.9. TRATAMIENTO DE LOS DATOS

Para poder realizar el tratamiento de los datos obtenidos del análisis de muestras de distintos orígenes, se suelen usar diferentes estrategias de tratamiento estadístico, de estos datos.

Por lo que los laboratorios, utilizan una gran variedad de herramientas estadísticas definidas para usos generales o concretos. Los datos se deben obtener mínimo por triplicado, para mayor seguridad de los mismos y luego se procede a definir qué o cual herramienta nos sirve para el propósito que nos hemos planteado.

En nuestro caso, el fin es el comparar, relacionar o asociar muestras, y por lo tanto se deben emplear 2 herramientas, entre las que se mencionan:

1. Comparación de varianzas a través de los test de Fisher, Bartlett o Levene.
2. Comparación de medias: con varianzas iguales o diferentes

III.9.1 ENSAYOS DE COMPARACIÓN DE VARIAS VARIANZAS

En la comparación de tres o más varianzas, se decide con cierta probabilidad, si son todas iguales, o al menos una de ellas es distinta de las demás. [26]

Se acepta H_0 si $F_{cal} < F_{tab}$ y las varianzas son iguales. La hipótesis nula y la hipótesis alternativa son:

$$H_0: S^2_1 = S^2_2 = \dots S^2_j = \dots = S^2_h$$

$$H_1: S^2_1 \neq S^2_2 = \dots S^2_j \neq \dots \neq S^2_h$$

Si se acepta H_0 las series son homogéneas, y si no se acepta, al menos una de las series tiene una varianza distinta a las demás.

III.9.2 PRUEBA DE BARTLETT

La prueba de Bartlett es la técnica que mas es usada para comparar las varianzas de varias muestras y para determinar si las muestras son iguales. Si hay igualdad esto se denomina homogeneidad u homocedásticidad de las varianzas En esta prueba los n_i en cada valor de X no necesitan ser iguales; sin embargo se recomienda que los n_i no sean menores que 3 y muchos de los n_i deben ser mayores de 5.

Para el desarrollo de la prueba de Bartlett se debe calcular inicialmente una varianza conjunta, definida como:

$$S^2 = \frac{\sum (n_i - 1)S_i^2}{\sum (n_i - 1)}$$

En donde se toman en cuenta todas las varianzas de las n_i muestras. Una vez obtenido su valor se calcula un factor de corrección definido por C.

$$C = \frac{1 + \sum_{i=1}^h \left(\frac{1}{n_i - 1} - \frac{1}{N - h} \right)}{3(h - 1)}$$

En donde N es el número total de datos, h es el número de series y N-h es número total de grados de libertad.

$$\chi^2 = \frac{1}{C} \left| (N - h) \ln S^2 - \sum_{i=1}^h (n_i - 1) \ln S_i^2 \right|$$

En esta prueba las hipótesis nula y alternativa son:

$$H_0 = S_1^2 = S_2^2 = S_3^2 = S_4^2 = S_5^2 = \dots S_i^2$$

$$H_1 = S_1^2 \neq S_2^2 \neq S_3^2 \neq S_4^2 \neq S_5^2 \neq \dots S_i^2$$

Se acepta H_0 si:

$$\chi_{\text{cal}}^2 < \chi_{h-1,0.05}^2$$

Se rechaza en caso contrario.

III.9.3 ANOVA DE UN FACTOR

Análisis de varianza (**ANOVA**, según terminología inglesa) es una colección de modelos estadísticos y sus procedimientos asociados. El análisis de varianza sirve para comparar si las medias de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintas a los valores de otro o más conjuntos de datos. El procedimiento para comparar estos valores está basado en la varianza global observada en los grupos de datos numéricos a comparar.

Típicamente, el análisis de varianza se utiliza para asociar una probabilidad a la conclusión de que la media de un grupo de puntuaciones es distinta de la media de otro grupo de puntuaciones.

El ANOVA se basa en la descomposición de la variación total de los datos con respecto a la media global (SCT), que bajo el supuesto de que H_0 es cierta con una cierta estimación obtenida a partir de toda la información muestral, en dos partes:

1. **Variación dentro de las muestras (SCD) o Intra grupos**, cuantifica la dispersión de los valores de cada muestra con respecto a sus correspondientes medias.
2. **Variación entre muestras (SCE) o Inter-grupos**, cuantifica la dispersión de las medias de las muestras con respecto a la media global.

Las expresiones para el cálculo de los elementos que intervienen en el Anova son las siguientes:

$$\text{Media Global: } \bar{X} = \frac{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} X_{ij}}{n}$$

$$\text{Variación Total: } SCT = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (X_{ij} - \bar{X})^2$$

$$\text{Variación Intra-grupos: } SCD = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (X_{ij} - \bar{X}_j)^2$$

Variación Inter-grupos:

$$SCE = \sum_{j=1}^k (\bar{X}_j - \bar{X})^2 n_j$$

MARCO TEÓRICO

Siendo x_{ij} el i -ésimo valor de la muestra j -ésima; n_j el tamaño de dicha muestra y \bar{x}_j su media. Cuando la hipótesis nula es cierta $SCE/K-1$ y $SCD/n-K$ son dos estimadores insesgados de la varianza poblacional y el cociente entre ambos se distribuye según una F de Snedecor con $K-1$ grados de libertad en el numerador y $N-K$ grados de libertad en el denominador.

Por lo tanto, si H_0 es cierta es de esperar que el cociente entre ambas estimaciones será aproximadamente igual a 1, de forma que se rechazará H_0 si dicho cociente difiere significativamente de 1.

En esta prueba las hipótesis nula y alternativa son:

$$H_0 = \bar{X}_1 = \bar{X}_2 = \bar{X}_3 = \bar{X}_4 = \bar{X}_5 = \dots \bar{X}_i$$

Se acepta H_0 si:
$$H_1 = \bar{X}_1 \neq \bar{X}_2 \neq \bar{X}_3 \neq \bar{X}_4 \neq \bar{X}_5 \neq \dots \bar{X}_i$$

$$F_{\text{cal}}^2 < F_{(h-1), (N-h), 0.05}^2$$

Se rechaza en caso contrario.

El ANOVA se basa en la comparación de la variabilidad media que hay entre los grupos con la variabilidad que hay dentro de los grupos.

Un método computacional conocido como tabla ANOVA facilita los cálculos. Se trata de disponer en forma de tabla ciertas cantidades que conducen a la obtención del F calculado. En la Tabla, se muestra la tabla de resultados de ANOVA.

Tabla de ANOVA de un factor.

Variabilidad	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrados Medios	F_{cal}
Entre	$SCE = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (\bar{x}_i - \bar{x})^2$ $= \sum_{i=1}^k n_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2$	$k - 1$	$MSE = \frac{SS_E}{k-1}$	$\frac{MSE}{MSD}$
Dentro	$SCD = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2$ $= \sum_{i=1}^k (n_i - 1) x_i^2$	$n - k$	$MSD = \frac{SS_D}{n-a}$	
Total	$SCT = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - \bar{x})^2$	$n - 1$		

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 EQUIPOS

1. Balanza analítica (Ohaus, EP 210)
2. Balanza analítica (Lab. Metales pesados)
3. Horno de convección (Telco)
4. pH-metro (Mettler Toledo)
5. Campana extractora de gases (Labconco)
6. Refrigeradora (White Westinghouse)
7. Cubeta para análisis cromatográficos
8. Cocina (Fisher Scientific)

IV.2 MATERIALES

- Beaker de 10, 50 y 100 ml (Pyrex)
- Balones aforados de 100 y 1000 ml (Pyrex)
- Varilla de agitación de vidrio
- Espátula
- Vidrio reloj (Pyrex)
- Matraz de aforación de 250 ml (Pyrex)
- Bureta de 100 ml (Pyrex)
- Probeta de 10 y 100 ml (Pyrex)
- Pizeta de 500 ml (Pyrex)
- Jeringas de insulina descartables
- Guantes desechables (Napros)
- Papel Filtro
- Embudo
- Soporte universal
- Clamp para buretas
- Papel indicador
- Desecador de vidrio (Pyrex)
- Pipeta volumétrica de 1 y 50 ml

MATERIALES Y MÉTODOS

- Papel Whatman N° 40
- Papel toalla
- Secador de pelo

IV.3 REACTIVOS

1. Hidróxido de potasio
2. Ácido sulfúrico
3. Tiosulfato de sodio
4. Dicromato de potasio
5. Cloroformo
6. Yoduro de potasio
7. Yodo
8. Almidón soluble
9. Azul de bromofenol (Fisher,)
10. n-butanol
11. Ácido acético
12. Ácido fórmico
13. Hidróxido de sodio
14. Acetato de plomo
15. Carbón activado
16. Oxalato de sodio

IV.4 SOLUCIONES

1. SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE ÁCIDO MÁLICO

Pesar 0.1 g de ácido málico, disolverlos en 20 ml de agua y trasladar a un matraz de 100 ml y aforar.

2. SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE ÁCIDO LÁCTICO

Tomar 0.1 ml de ácido láctico, trasladar a un matraz de 100 ml y aforar.

3. SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE ÁCIDO TARTÁRICO

Pesar 0.1 g de ácido tartárico, disolverlos en 20 ml de agua y trasladar a un matraz de 100 ml y aforar.

4. SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE ÁCIDO SUCCÍNICO

Pesar 0.1 g de ácido succínico, disolverlos en 20 ml de agua y trasladar a un matraz de 100 ml y aforar.

5. SOLUCIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO AL 50 %

Tomar 50 ml de ácido acético, trasladar a un matraz de 100 ml y aforar.

6. SOLUCIÓN "PRIMERA FASE MÓVIL"

- ✓ Pesar 0.1 g de azul de bromofenol, disolverlos en 100 ml de n-butanol (primera solución).
- ✓ Preparar 100 ml de ácido acético al 50 % (segunda solución).
- ✓ Tomar 50 ml de la primera solución más 25 ml de la segunda solución (Primera Fase Móvil Eluyente).

7. SOLUCIÓN "SEGUNDA FASE MÓVIL"

Tomar 50 ml de n-propanol y 5.5 ml de ácido fórmico, trasladar a un matraz de 100 ml y aforar.

MATERIALES Y MÉTODOS

8. SOLUCIÓN REVELADORA "TERCERA FASE MÓVIL"

Pesar 1 g de azul de bromofenol, diluir en 100 ml de agua.

9. SOLUCIÓN DE HIDRÓXIDO DE POTASIO 1N

Pesar 11.5 g de KOH, disolverlos en agua y trasladar a un matraz de 250 ml y aforar.

10. SOLUCION DE ÁCIDO SULFÚRICO 1:3

Tomar 50 ml de agua en un beaker y agregar 25 ml de H₂SO₄, trasladar a un matraz de 100 ml y aforar.

11. SOLUCIÓN DE TIOSULFATO DE SODIO

Disolver 25 g de Na₂S₂O₃ en 200 ml de agua, transferir a un matraz de 1000 ml, agregar 1 ml de cloroformo y aforar.

12. SOLUCIÓN DE DICROMATO DE POTASIO 0.1 N

Disolver 4.904 g de K₂Cr₂O₇ en agua y aforar a 1000 ml.

13. SOLUCIÓN DE YODO 0.1 N

Disolver 10 g de KI en 25 ml de agua, añadir 3.25 g de I₂, transferir a un matraz de 250 ml y aforar. Estandarizar con la solución de Na₂S₂O₃ 0.1 N.

14. SOLUCIÓN DE YODO 0.02 N

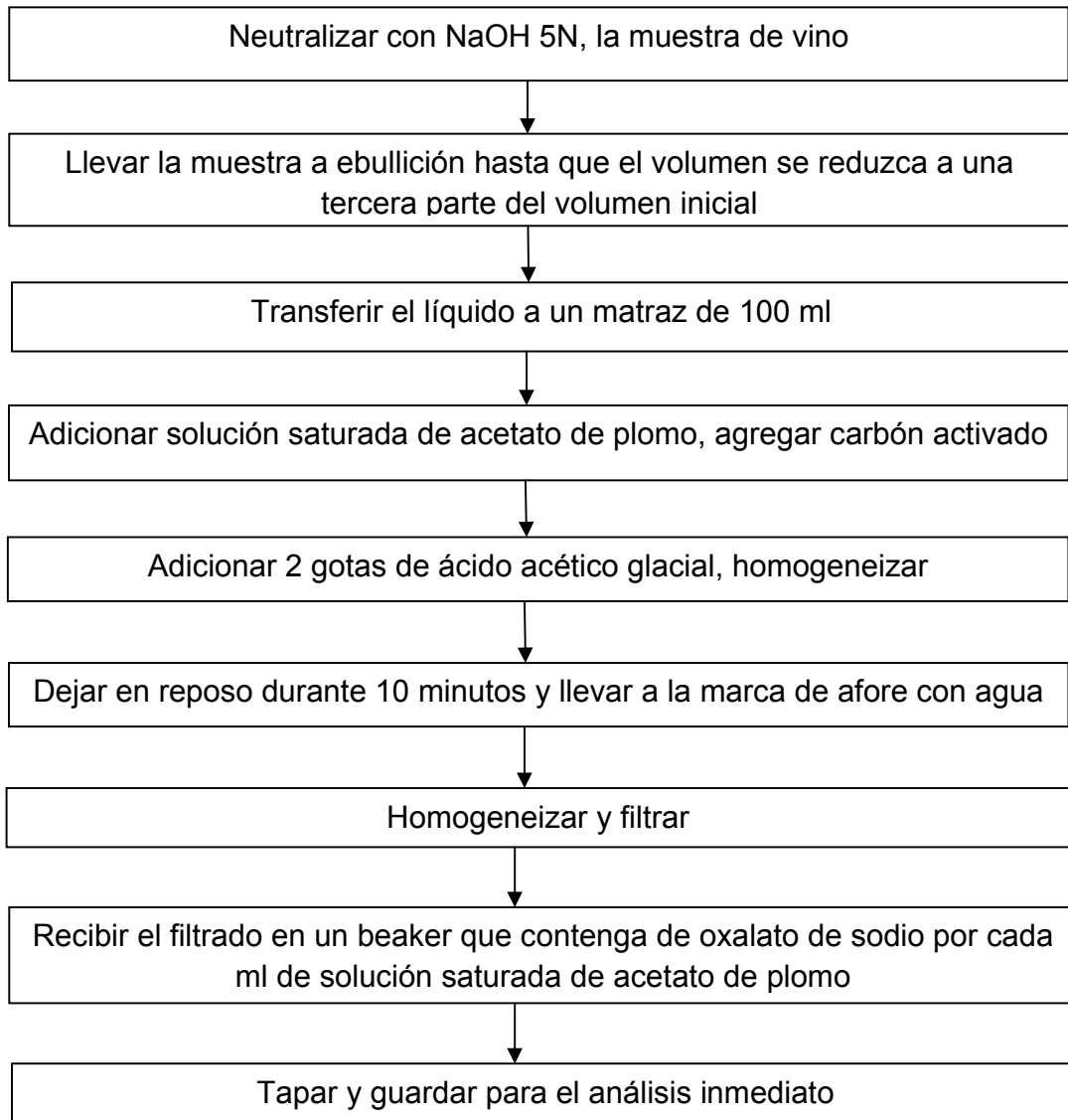
Tomar 50 ml de la solución de I₂ 0.1 N, ponerlo en un matraz de 250 ml y llevarlo a afore.

15. SOLUCIÓN DE ALMIDÓN AL 1%

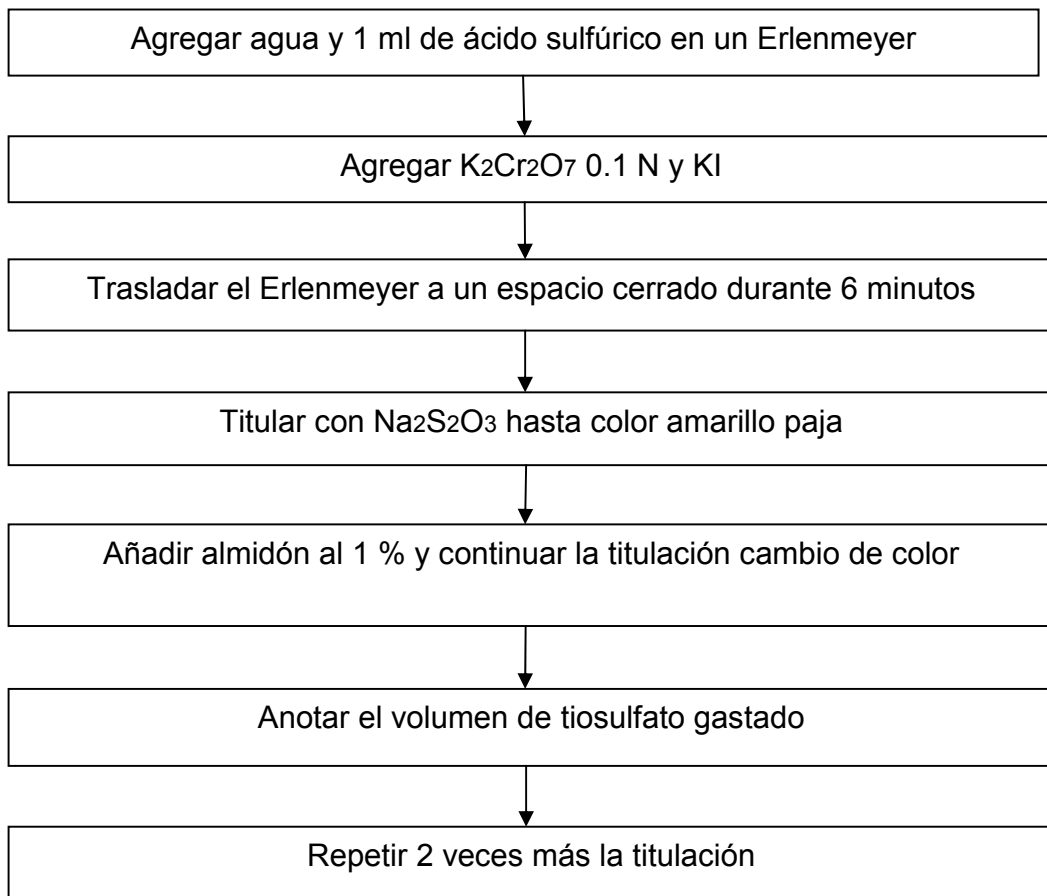
Pesar 1 g de almidón, agregar 2 ml de agua hasta hacer una pasta, agregar 100 ml de agua hirviendo, enfriar y agregar 1 ml de cloroformo.

IV.5 METODOLOGÍA

IV.5.1 PREPARACIÓN Y DESALCOHOLIZACIÓN DE LA MUESTRA



IV.5.2 ESTANDARIZACIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1 N



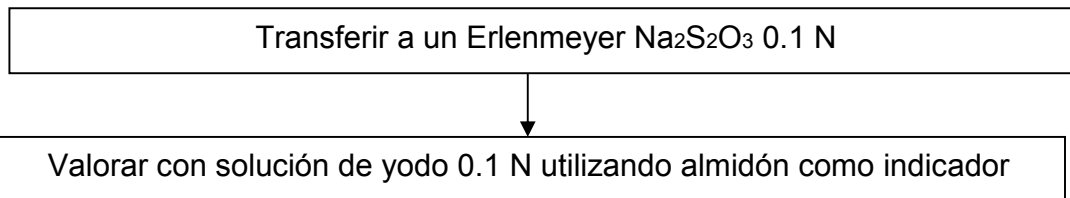
Calcular la concentración del $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ mediante la siguiente ecuación:

$$N_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} = \frac{m_{\text{KI}}}{V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}}$$

Donde: m_{KI} = es el peso de KI empleado.

$V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$ = es el volumen consumido en la estandarización

IV.5.3 VALORACIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE I₂ 0.1 N



Calcular la concentración del I₂ mediante la siguiente ecuación:

$$N_{I_2} = \frac{V_{Na_2S_2O_3} N_{Na_2S_2O_3}}{V_{I_2}}$$

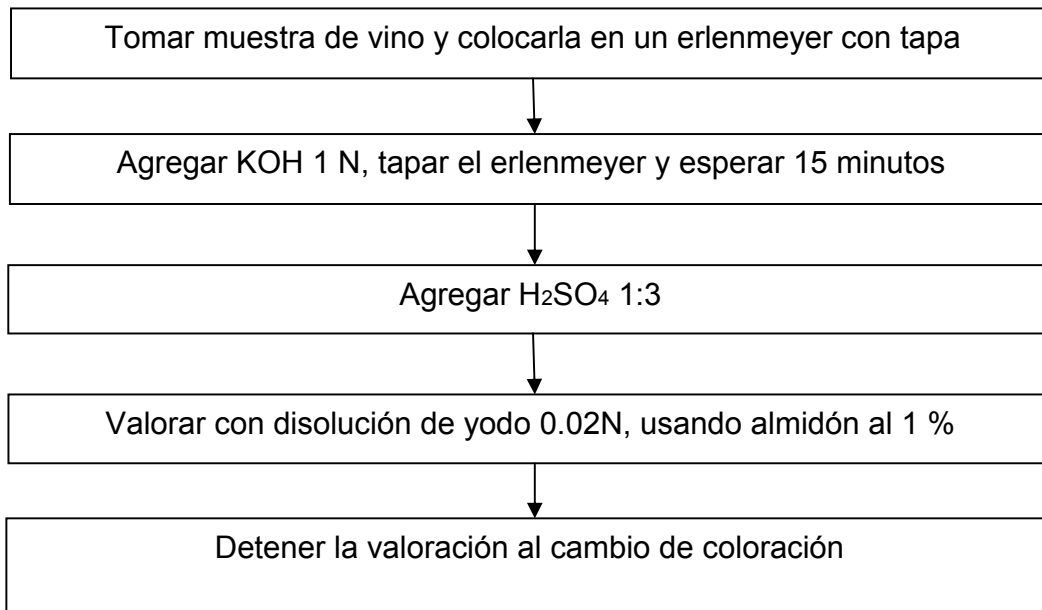
Donde:

V_{I₂} = es el volumen de yodo consumido

V_{Na₂S₂O₃} = es el volumen de tiosulfato empleado

N_{Na₂S₂O₃} = es la normalidad del tiosulfato empleado

IV.5.4 DETERMINACIÓN DE ANHÍDRIDO SULFUROSO TOTAL



El contenido de anhídrido sulfuroso se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$ppm_{SO_2} = \frac{V_{I_2} N_{I_2} p_{eq_{SO_2}} 1000}{V_{Vino}}$$

$$ppm_{SO_2} = \frac{V_{I_2} \times 0.02 \times 32 \times 1000}{50} = V_{I_2} \times 12.8$$

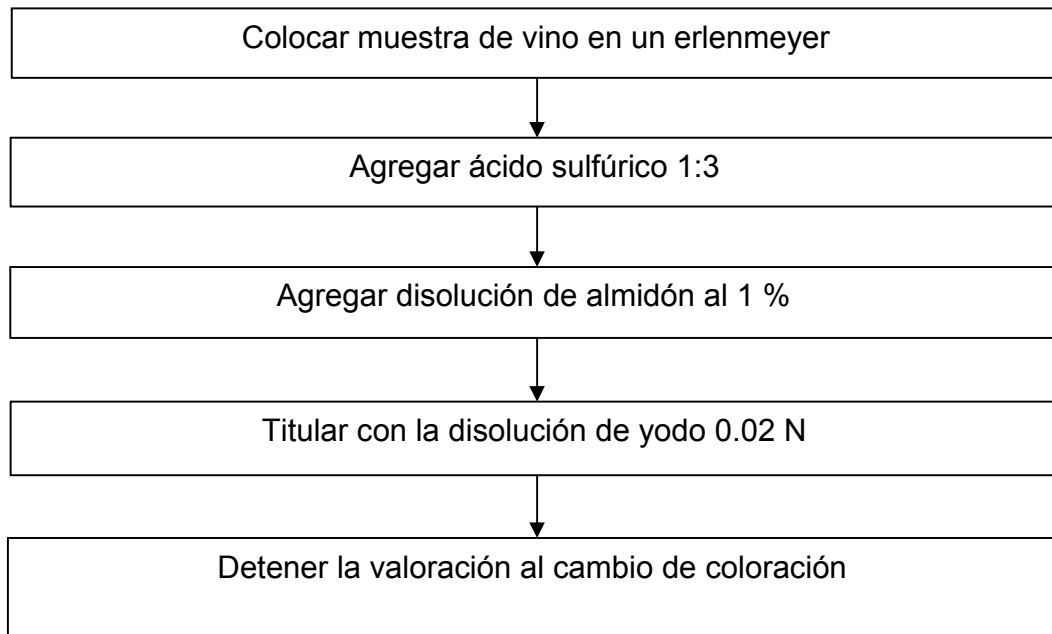
Donde:

$$P_{eq_{SO_2}} = 64/2$$

V_{I_2} = volumen de I₂ consumidos en la titulación en ml.

ppm_{SO_2} = partes por millón o mg/L de SO₂ total.

IV.5.5 DETERMINACIÓN DEL ANHÍDRIDO SULFUROSO LIBRE



El contenido de anhídrido sulfuroso se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$ppm_{SO_2} = \frac{V_{I_2} N_{I_2} peq_{SO_2} 1000}{V_{Vino}}$$

$$ppm_{SO_2} = \frac{V_{I_2} \times 0.02 \times 32 \times 1000}{50} = V_{I_2} \times 12.8$$

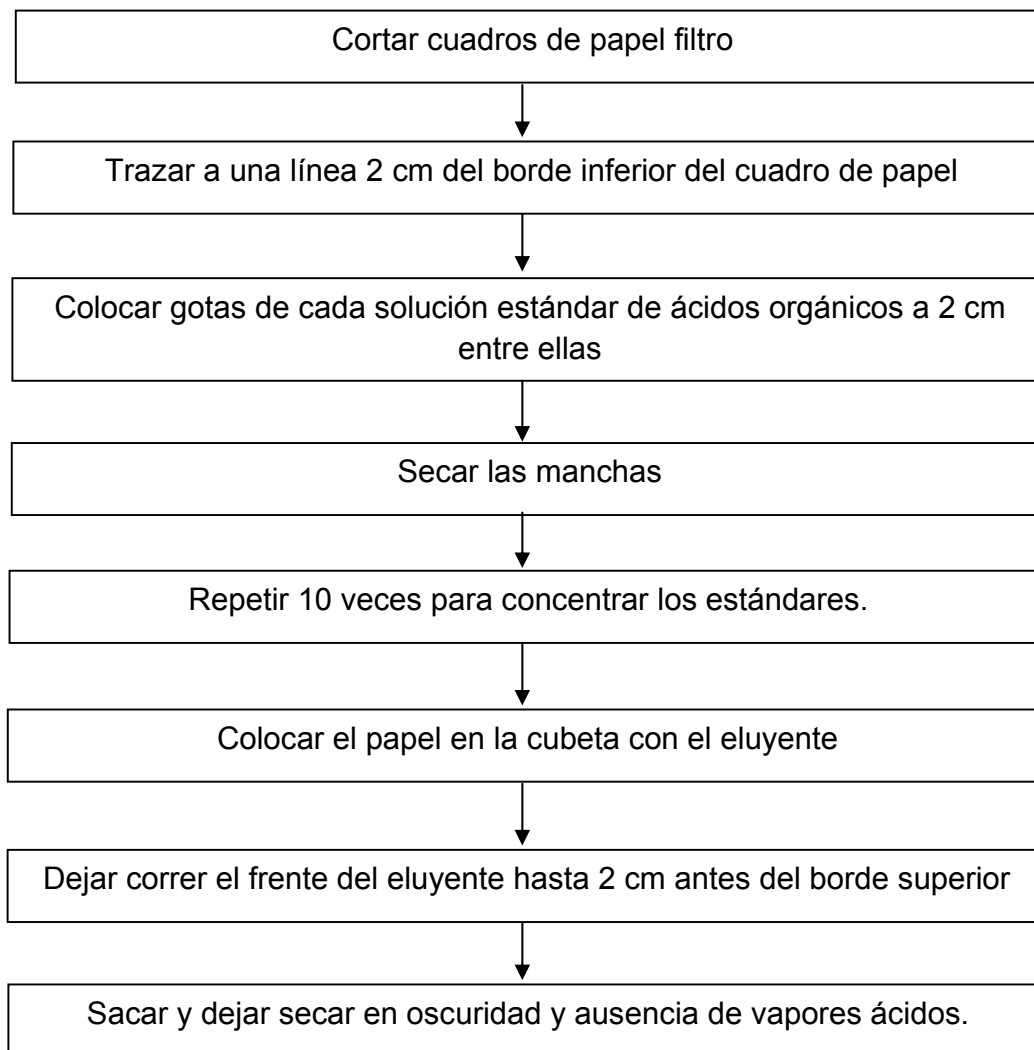
Donde:

$$Peq_{SO_2} = 64/2$$

V_{I_2} = volumen de I_2 consumidos en la titulación en ml.

ppm_{SO_2} = partes por millón o mg/L de SO_2 total.

IV.6 IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS EN VINOS



Calcular los R_f de las manchas de los ácidos orgánicos

$$R_f = \frac{d_{\text{analito}}}{d_{\text{eluyente}}}$$

Donde:

d_{analito} = distancia recorrida por el analito en la placa cromatográfica

d_{eluyente} = volumen de I2 consumidos en la titulación en ml.

V. ANÁLISIS DE RESULTADOS

V.1 OPTIMIZACIÓN DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE ACIDOS ORGÁNICOS EN VINOS DE FRUTAS.

V.1.1 SELECCIÓN DE MATERIAL CROMATOGRÁFICO

En la determinación de ácidos orgánicos se utilizaron 3 tipos diferentes de materiales cromatográficos, los que fueron comparadas para seleccionar el más apto para realizar los análisis, los materiales utilizados fueron:

- a. Silica Gel
- b. Papel filtro normal
- c. Papel Whatman N° 1

Estos fueron utilizados empleando una fase móvil o de elusión similar, de forma que los ácidos orgánicos se separaran en las mismas condiciones. De esta forma se ensayaron estándares de 5 mg/L de los siguientes ácidos orgánicos:

1. Ácido málico
2. Ácido láctico
3. Ácido tartárico
4. Ácido succínico

Los resultados obtenidos muestran que el papel filtro es el más adecuado para la separación cromatográfica de los ácidos orgánicos, ya que permite un mejor desplazamiento de las manchas de los ácidos orgánicos. La superficie intersticial y la estructura porosa del papel de filtro empleado permiten un mejor arrastre y un mayor desplazamiento de las manchas correspondientes a los ácidos grasos, lo que ayuda a la clara identificación de los compuestos estudiados. En la figura V.1, se muestra los resultados obtenidos.



Figura V.1 Separación cromatográfica de estándares de ácidos orgánicos de 5 mg/L en papel filtro: 1 = ácido málico, 2 = ácido láctico, 3= ácido tartárico y 4 = ácido succínico.

V.1.2 SELECCIÓN DE FASE MÓVIL ELUYENTE

En la selección de fase móvil eluyente se emplearon 4 diferentes fases móviles, estas fueron:

1. Mezcla de n-butanol conteniendo azul de bromofenol y ácido acético al 50 %.
2. n-propanol, agua y ácido fórmico al 90 %, revelada con solución de azul de bromofenol.
3. Ácido fórmico, n-propanol y agua, revelada con solución de azul de bromofenol.
4. n-butanol, revelada con solución de azul de bromofenol.

Estas fases móviles fueron comparadas empleando para esto papel filtro, el que ya se había determinado como el material óptimo para la separación cromatográfica.

Los resultados obtenidos muestran que en los casos de las 3 últimas fases móviles ensayadas, no se lograba la completa separación de las manchas de los ácidos orgánicos empleados. Siendo la más óptima la primera fase móvil consistente de una mezcla de n-butanol conteniendo azul de bromofenol y ácido acético al 50 %. En la figura V.2, se muestran los resultados de una de las fases móviles empleadas en la que se demuestra que no eran capaces de separar los compuestos a diferencia de la primera fase móvil ensayada, lo que se muestra en la Figura V.3.



Figura V.2 Fase móvil de n-butanol, revelada con solución de azul de bromofenol, empleada en la separación cromatográfica de estándares de ácidos orgánicos de 5 mg/L en papel filtro: 1 = ácido málico, 2 = ácido láctico, 3= ácido tartárico y 4 = ácido succínico.



Figura V.3 Separación cromatográfica de estándares de ácidos orgánicos empleando como fase móvil una Mezcla de n-butanol conteniendo azul de bromofenol y ácido acético al 50 %.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tal y como se observa en la figura V.2, la fase móvil de n-butanol, revelada con azul de bromofenol, no es capaz de separar los ácidos orgánicos, sin embargo la mezcla de n-butanol conteniendo azul de bromofenol y ácido acético al 50 % si es capaz de separar los ácidos, lo que se muestra en la figura V.3, siendo por lo tanto esta mezcla la que se empleó en la separación e identificación de estos ácidos en las muestras de vinos a ser analizadas.

V.1.3 FACTORES DE RETENCIÓN DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS

Una vez que se seleccionó el material de separación cromatográfica y la fase móvil eluyente, se procedió a determinar el factor de retención de los ácidos orgánicos, mediante la siguiente ecuación:

$$R_f = \frac{d_{analito}}{d_{eluyente}}$$

Los resultados se muestran en la tabla V.1.

Tabla V.1. Factores de retención de los estándares de ácidos orgánicos.

ÁCIDOS ORGÁNICOS	R _f
Ácido málico	0.512
Ácido láctico	0.810
Ácido tartárico	0.352
Ácido succínico	0.783

Tal y como se muestra en la tabla V.1, los valores de los R_f de los estándares de los ácidos orgánicos, se encuentran en el rango de los valores de R_f, reflejados en la bibliografía, lo que demuestra la óptima separación cromatográfica realizada con el papel filtro y la fase móvil de n-butanol conteniendo azul de bromofenol y ácido acético al 50 %.

V.1.4 IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS EN MUESTRAS DE VINO DE FRUTAS

Dado que en la segunda fermentación de los vinos o fermentación malo-láctica, se desarrolla hasta la completa desaparición de los ácidos lácticos y málicos, es posible cromatográficamente determinar el momento de su finalización, dándole seguimiento a la desaparición de estos ácidos en el vino. Es posible por tanto utilizar esta técnica como un indicador de la finalización de esta fermentación.

Para identificar la presencia o ausencia de estos ácidos orgánicos, se utilizaron muestras de:

- a. Vino de Flor de Jamaica de Chinantlan
- b. Vino de flor de Jamaica de fabricación propia (Mi vino)
- c. Vino Tinto de uvas.

El vino de uvas fue tomado como referencia, dado que sigue un procedimiento de elaboración perfectamente establecido, bajo determinadas normas y procedimientos de operación estandarizados. Lo que no ocurre con las otras muestras de vino estudiadas, ya que siguen un proceso semi-industrial en un caso (Chinantlan) y netamente artesanal en el otro (Mi vino), respectivamente.

Para esto se tomaron muestras de los vinos mencionados, y se cromatografiaron en conjunto con un estándar de ácido málico como referencia, determinándose la presencia de ácidos orgánicos en las muestras de vino, por la posición de las manchas y su confirmación mediante el cálculo del R_f y su comparación con los de los estándares de los ácido orgánicos.

Los resultados de los R_f obtenidos en las distintas muestras de vino, se muestran en la tabla V.2.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla V.2. Factores de retención de muestras de vino

VINO	R _f			
	ÁCIDO MÁLICO	ÁCIDO LÁCTICO	ÁCIDO TARTÁRICO	ÁCIDO SUCCÍNICO
Mi vino	0.492	ND	ND	ND
Chinantlan	0.487	0.823	ND	ND
Rey de copas	ND	0.835	ND	ND

Tal y como se muestra en la tabla V.2, se detectó en las muestras de vino: Mi vino y Chinantlan la presencia de ácido málico, el cual fue confirmado mediante el cálculo de los valores de su R_f, los que se ubicaban tanto dentro del rango de R_f reportados en la bibliografía como del rango calculado a partir de los estándares analizados en nuestras condiciones de laboratorio, cabe destacar que en la muestra de vino de uvas, no fue detectada la presencia de éste ácido.

Los resultados así obtenidos indican que tanto en el vino elaborado por Chinantlan como en el elaborado en nuestras condiciones, no había terminado la fermentación malo-láctica, lo cual puede deberse entre otras causas a los tiempos que se les daban a los procesos de fermentación. En la bibliografía se refleja que tanto la fermentación alcohólica como la malo-láctica deben ser realizadas en tiempos mayores a un mes, lo que no ocurrió tanto en el vino de Chinantlan como en el de elaboración propia. Llama la atención el hecho de en la muestra de vino de uvas, no se detectó la presencia de ácido málico, lo que indica que en este vino si, se le dio el tiempo suficiente para la finalización de la fermentación malo-láctica, lo que tiene relación con óptimos procesos de fabricación de este vino.

Por otra parte, se detectó la presencia de ácido láctico en las muestras de vino Chinantlan y Rey de Copas, el que está relacionado como producto de la fermentación malo-láctica, este no fue detectado en la muestra de vino de elaboración propia.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Esto nos lleva a inducir que en el caso de la muestra de vino Rey de Copas, había finalizado la fermentación malo-láctica, dado que presentaba ausencia de ácido málico y presencia de ácido láctico, y en la muestra de Chinantlan, la fermentación había finalizado parcialmente dado que presentaba tanto ácido málico como ácido láctico. En el caso del vino de elaboración propia, la única presencia de ácido málico nos indica que la fermentación malo-láctica, no había finalizado totalmente.

Lo anterior, nos indica que la cromatografía en papel con uso de fase móvil de n-butanol y ácido acético al 50%, que lleva incorporado el azul de bromofenol, como revelador, es un buen indicador del inicio y finalización del proceso de fermentación malo-láctico, lo que podría ser de utilidad como indicador de calidad en la elaboración de vino.

V.2 DETERMINACIÓN DE SULFITO TOTAL Y LIBRE

La determinación de sulfito total y libre en las muestras de vinos analizadas, se determinó mediante volumetría, los resultados obtenidos se muestran en la tabla V.3.

Tabla V.3 Contenido medio de sulfito total y libre en las muestras de vino.

MUESTRAS	SULFITO TOTAL (mg SO ₂ /L)	SULFITO LIBRE (mg SO ₂ /L)
Mi vino	6.82	2.56
Chinantlan	28.16	4.74
Rey de Copas	5.54	2.12

En la figura V.4 se muestran los resultados de la Tabla V.3 en forma de gráfico de barras.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

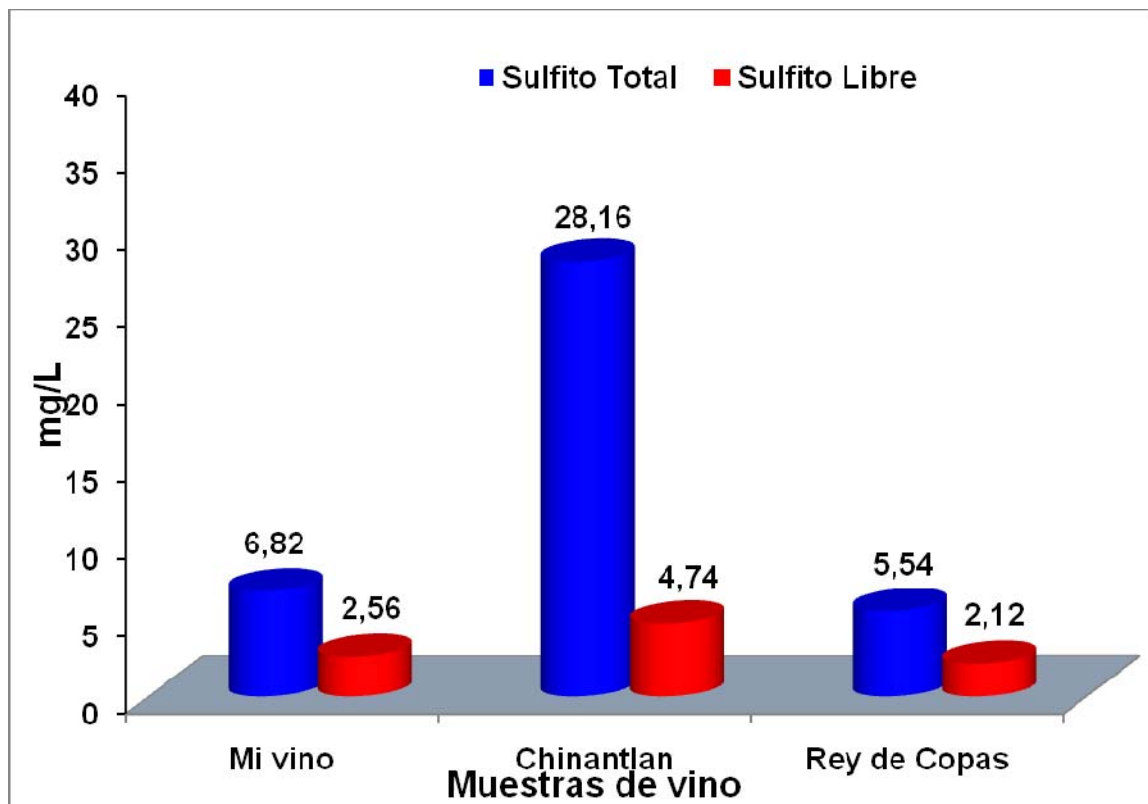


Figura V.4 Gráfico de mg/L de contenido medio de sulfito total y libre en muestras de vinos.

Tal y como se observa en la figura V.4, existen diferencias entre las muestras analizadas en relación al contenido de sulfito total y libre. Así la muestra de Chinantlan presenta mayor cantidad de sulfito total y libre en comparación con las demás muestras (28.16 y 4.74 mg/L respectivamente), mientras que la muestra de Rey de Copas presentó las menores, 5.54 y 2.12 mg/L respectivamente. Estas diferencias pueden ser debidas entre otras cosas a discrepancias en los procesos de elaboración de los vinos, a las distintas cantidades de metabisulfito añadidas en los pasos de la cadena de elaboración, a los tipos de extracto de frutas empleados en la fabricación (Flor de Jamaica y Uvas) y a las diferencias en las condiciones ambientales y geográficas de las fabricas involucradas en la elaboración de los vinos estudiados.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

V.2.1 COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DE SULFITOS

Dado que gráficamente se observaron diferencias en los contenidos de sulfito libre y total en las muestras de vino analizadas, se consideró la utilización de herramientas estadísticas de comparación de resultados para confirmar las diferencias observadas. Para esto se comparó inicialmente a los vinos en relación a los contenidos de sulfito total y libre. En la tabla V.4, se muestra los datos comparados, cabe destacar que en la comparación se emplearon las medias de los contenidos en mg/L de sulfito total y libre.

Tabla V.4 Contenido medio de sulfito total, libre, media, desviación estándar y varianza, de las muestras de vino.

PARÁMETRO	MI VINO	CHINANTLAN	REY DE COPAS
Sulfito Total	6.82	28.16	5.54
Sulfito Libre	2.56	4.74	2.12
Media	4.69	16.45	3.83
S	3.01	16.56	2.42
S ²	9.07	274.25	5.85

Los datos fueron sometidos a un test de Bartlett para determinar si las varianzas de los vinos en relación a su contenido total y libre de sulfito. Las hipótesis nula y alternativa planteadas fueron:

$$H_0 : S_{Chinantlan}^2 = S_{Mi\ vino}^2 = S_{Rey\ de\ Copas}^2$$

$$H_1 : S_{Chinantlan}^2 \neq S_{Mi\ vino}^2 \neq S_{Rey\ de\ Copas}^2$$

Determinándose que H₀ se acepta si $X_0^2 < X_{(0.05;h-1)}^2$. Los resultados así obtenidos se muestran en la tabla V.5.

Tabla V.5 Resultado del test de Bartlett, aplicado a los datos de la tabla V.4.

PARÁMETRO	VALOR
C	1.50
S ² _{conj}	96.39
χ ² ₀	2.75
χ ² _(0.05, 2)	5.9915

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tal y como se observa en la tabla V.5, las varianzas son iguales es decir son homocedásticas y por lo tanto es posible aplicar el análisis de varianza para comparar las medias de los vinos en lo relativo a sus contenidos de sulfito total y libre. En este caso las hipótesis nula y alternativa planteadas fueron:

$$H_0 : \bar{x}_{Chinantlan} = \bar{x}_{MI\ vino} = \bar{x}_{Rey\ de\ Copas}$$

$$H_1 : \bar{x}_{Chinantlan} \neq \bar{x}_{MI\ vino} \neq \bar{x}_{Rey\ de\ Copas}$$

En la tabla V.6, se muestran los resultados del ANOVA aplicado.

Tabla V.6 Resultado del ANOVA, aplicado a los datos de la tabla V.4.

ORIGEN DE LAS VARIACIONES	SC	GL	CM	F _{cal}	F _{tab}
Entre grupos	198.87	2	99.43	1.03	9.55
Dentro de los grupos	289.17	3	96.39		
Total	488.04	5			

Tal y como se observa en la tabla V.6, el F_{cal} es menor que el F_{tab}, por lo tanto, las medias de los resultados son iguales, esto es que no hay diferencias entre los vinos estudiados si tomamos como parámetros los sulfito total y libre.

Finalmente se compararon los contenidos de sulfitos. Para esto se invirtió los datos de la tabla V.4 y se obtuvo una nueva matriz de comparaciones, los datos así ordenados se muestran en la tabla V.7.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla V.7 Contenido medio de sulfito total, libre, media, desviación estándar y varianza, de las muestras de vino.

VINO	SULFITO TOTAL	SULFITO LIBRE
Rey de Copas	5.54	2.12
Mi vino	6.82	2.56
Chinantlan	28.16	4.74
Media	13.51	3.14
S	12.71	1.40
S ²	161.45	1.97

Los datos fueron sometidos a un test de comparación de medias de dos conjuntos de datos, o test de Fisher, para determinar si las varianzas de los contenidos de sulfito total y libre eran iguales en relación a los vinos estudiados y de esta forma determinar el tipo de comparación de medias que aplicarle a estos parámetros. Las hipótesis nula y alternativa planteadas fueron:

$$H_0 : S_{Sulfito\ Total}^2 = S_{Sulfito\ Libre}^2$$

$$H_1 : S_{Sulfito\ Total}^2 \neq S_{Sulfito\ Libre}^2$$

Determinándose que H_0 se acepta si $F_{cal} < F_{tab(0.05;h-1)}$. Los resultados así obtenidos se muestran en la tabla V.5.

Los resultados de la comparación de varianzas indican que las varianzas de los contenidos de sulfito total y libre son distintas, por lo que procedimos a la comparación de las medias de estos contenidos utilizando una prueba de contraste suponiendo varianzas diferentes.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla V.8 Resultado de la comparación de varianzas de los contenidos de sulfito total y libre en las muestras de vino.

	SULFITO TOTAL	SULFITO LIBRE
Media	13.51	3.14
Varianza	161.45	1.97
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
Fcal	82.02	
Ftab (una cola)	19.00	

Para la comparación de medias planteamos las siguientes hipótesis:

$$H_0 : \bar{x}_{\text{Sulfito Total}} = \bar{x}_{\text{Sulfito Libre}}$$

$$H_1 : \bar{x}_{\text{Sulfito Total}} \neq \bar{x}_{\text{Sulfito Libre}}$$

En la tabla V.9, se muestran los resultados de la comparación de las medias de los contenidos de sulfito total y libre.

Tabla V.9 Resultado de la comparación de medias de los contenidos de sulfito total y libre en las muestras de vino.

	SULFITO TOTAL	SULFITO LIBRE
Media	13.51	3.14
Varianza	161.45	1.97
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	
t _{cal}	1.40	
t _{tab} (dos colas)	4.30	

Tal y como se observa en la tabla V.9, el t_{cal} es menor que el t_{tab}, por lo tanto, las medias de los resultados son iguales, esto es que no hay diferencias entre los contenidos de sulfito total y libre en los vinos estudiados, lo cual nos indica que a pesar de las diferencias observadas gráficamente, estas no son significativas, por lo

ANÁLISIS DE RESULTADOS

que los vinos estudiados pueden ser considerados similares estadísticamente hablando.

VI. CONCLUSIONES

1. Se optimizaron las condiciones cromatográficas para la separación de los ácidos orgánicos málico, láctico, tartárico y succínico, encontrándose que el papel filtro en conjunto con la fase eluyente de n-butanol y ácido acético al 50% conteniendo azul de bromofenol, presentaban las mejores separaciones. En estas condiciones los ácidos presentaban factores de retención de: 0.512, 0.810, 0.352 y 0.783 respectivamente.
2. Se identificaron los ácidos orgánicos málico y láctico en las muestras de vino Mi Vino, Chinantlan y Rey de Copas utilizando las condiciones cromatográficas ya optimizadas, encontrándose ácido málico en los vinos Mi Vino y Chinantlan y Láctico en los vinos Chinantlan y Rey de Copas.
3. Se determinó la cantidad de sulfito libre y total en muestras de vino, encontrándose que el vino Chinantlan posee la mayor cantidad de sulfito total y libre, 28.16 y 4.74 mg/L, mientras que el vino Rey de Copas presenta la menor cantidad de sulfito total y libre, 5.54 y 2.12 mg/L respectivamente.
4. Se comparó estadísticamente los contenidos de sulfito libre y total en las muestras de vino estudiadas, encontrándose que no existen diferencias significativas entre los vinos en relación a sus contenidos de sulfitos y de los sulfitos en relación a los vinos estudiados.

VII. RECOMENDACIONES

Una vez finalizada la presente monografía tomando en cuenta los resultados obtenidos, creemos conveniente realizar las siguientes recomendaciones:

1. Ampliar del universo de muestras para ajustar en mejores condiciones la separación cromatográfica de los ácidos orgánicos.
2. Cuantificar la cantidad de ácidos orgánicos en las muestras de vinos utilizando otra técnica cromatográfica como Cromatografía de Gas o Cromatografía Líquida de Alta Resolución.
3. Aumentar la cantidad de parámetros físico-químicos a ser estudiados en las muestras de vino.
4. Estudiar la posibilidad de trasladar la experiencia adquirida a empresas artesanales de elaboración de vinos de frutas de la Región del Occidente del país.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Los usos y maravillas de la Jamaica <http://www.alimentariaonline.com/desplegar>
2. Revista de divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol19num2/articulos/jamaica/>
3. Martin Macek - zonadiet.com. Los vinos. Descripción general.
4. Los alimentos y sus propiedades. Definición. http://www.arecetas.com/el_vino/index.html
5. Los vinos. Descripción general. <http://www.zonadiet.com/bebidas/a-vino.htm>
6. Definición del vino. Valle de Casablanca. <http://pdf.rincondelvago.com/origen-del-vino.html>
7. Laboratorio de operaciones unitarias III. Guías de fermentación <http://pdf.rincondelvago.com/fermentacion.html>
8. Fermentación alcohólica. http://es.wikipedia.org/wiki/Fermentaci%C3%B3n_alcoh%C3%B3lica
9. <http://www.aulafacil.com/Vino/Lecc-8.htm>
10. <http://www.diccionariodelvino.com/index.php/fermentacion-alcoholica>
11. Métodos de separación. <http://www.monografias.com/trabajos13/sep/sepal.shtml>
12. Cromatografía en papel. <http://es.scribd.com/doc/34245364/RESUMEN-SOBRE-CROMATOLOGRAFIA-EN-PAPEL>
13. Tipos de cromatografía en papel. <http://www.elergonomista.com/tecnicas/cp.htm>
14. Los ácidos del vino. <http://www.verema.com/articulos/498255-los-acidos-del-vino>
15. Artículo de determinación de acidez, ácidos en vino. Determinación de la presencia de ácido málico, tartárico, succínico y láctico por cromatografía sobre papel. <http://centros5.pntic.mec.es/ies.valdehierro/Dptofq/vinos/vinos.htm>
16. Ácidos orgánicos. Los ácidos. <http://www.verema.com/articulos/498255-los-acidos-del-vino>
17. Ácido málico. http://www.bedri.es/Libreta_de_apuntes/A/AC/Acido_malico.htm
18. Ácido láctico. http://www.agrovin.com/agrv/pdf/enologia/productos_enologicos/ACIDO_LACTICO_2010.pdf

BIBLIOGRAFÍA

19. Ácidos orgánicos. Ácido tartárico.

<http://centros5.pntic.mec.es/ies.valdehierro/Dptofq/vinos/vinos.htm#croma>

20. Ácidos orgánicos. Ácido succínico.

http://www.farum.it/glos_enol/show.php?glos_enol=20cf52c81204f81ff63140473f538e5e&id=1124

21. Valoraciones de soluciones.

<http://m26martinez.blogspot.com/2007/08/volumetria.html>

22. Análisis volumétrico.

http://es.wikipedia.org/wiki/An%C3%A1lisis_volum%C3%A9trico.

23. Vino con sulfitos. <http://www.gastronomiaycia.com/2008/06/25/vino-con-sulfitos>.

24. Diccionario del vino. Sulfitos. <http://diccionariodelvino.com/index.php/sulfitos>.

25. Dr. Sergio José López Grío. Procedimiento de ensayo para la determinación de anhídrido sulfuroso total y libre en vinos de frutas mediante volumetría redox.

26. Guillermo Ramis Ramos y María Celia García Álvarez-Coque. Ensayos de comparación de varias varianzas. Quimiometría.



A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD