

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**DETERMINACIÓN DE UREA EN VINOS COMERCIALES  
CHILENOS**

**CLAUDIA ANDREA PINO FUENTES**

Santiago, Chile  
2005

## INDICE

|  | <u>Pág</u> |
|--|------------|
| RESUMEN                                      | 1          |
| Palabras clave                               | 2          |
| SUMMARY                                      | 3          |
| Key words                                    | 3          |
| INTRODUCCION                                 | 4          |
| REVISION BIBLIOGRÁFICA                       | 6          |
| Compuestos nitrogenados del mosto            | 6          |
| Compuestos nitrogenados del vino             | 7          |
| Origen y contenido de urea en los vinos      | 8          |
| Formación de carbamato de etilo en los vinos | 10         |
| Determinación de urea en los vinos           | 12         |
| Método químico                               | 12         |
| Método enzimático                            | 12         |
| <b>MATERIALES Y MÉTODO</b>                   | 15         |
| Materiales                                   | 15         |
| Método                                       | 15         |
| Primer ensayo                                | 15         |
| Segundo ensayo                               | 16         |
| Diseño experimental y análisis estadístico   | 17         |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN                       | 18         |
| Primer ensayo                                | 18         |
| Calibración del método                       | 18         |
| Determinación de urea en vinos comerciales   | 19         |
| Determinación de urea en vinos Late Harvest  | 21         |
| Segundo ensayo                               | 22         |
| CONCLUSIONES                                 | 26         |
| LITERATURA CITADA                            | 27         |

## RESUMEN

El propósito de este estudio se basó en el desarrollo de dos ensayos. En el primero de ellos se pretendió determinar la concentración de urea en vinos comerciales chilenos, 15 vinos tintos y 5 Late Harvest, utilizando para los primeros un método colorimétrico y para los Late Harvest un método enzimático (Kit enzimático Urea-Amonio, Boehringer Mannheim).

En un segundo ensayo se pretendió evaluar la influencia del tiempo y la temperatura de almacenamiento, en la concentración de urea, en un vino tinto con una concentración inicial de 5 mg/L. Las mediciones se hicieron utilizando el método colorimétrico una vez por semana durante 2 meses.

Los vinos comerciales utilizados corresponden a vinos de 5 viñas escogidas al azar y para el segundo ensayo se utilizó vino en etapa de elaboración de la vendimia 2003 el cual se sometió a diferentes temperaturas para evaluar su efecto en la evolución de la concentración de urea.

Los resultados obtenidos permiten señalar que en los 15 vinos tintos utilizados no se presentan niveles altos de urea, lo que reduce las posibilidades de formación potencial de carbamato de etilo, a diferencia de uno de los cinco vinos Late Harvest que presentó una concentración mayor a los 3 mg/L.

Para el caso del vino sometido a distintas temperaturas se observa claramente una disminución en la concentración de urea en el tiempo, mayormente en el vino sometido a la temperatura más alta ( $37 \pm 1^\circ \text{C}$ ), lo que hace probable la formación de carbamato de etilo por efecto de esta variable.

Palabras claves

Compuestos nitrogenado; Carbamato de etilo; Urea.

## SUMMARY

The purpose of this study was based in the development of two ensay. The first one tried to determinate the urea concentration in chilean commercial wines, 15 red wines and 5 Late Harvest using for the first ones a colorimetric method and for the Late Harvest an enzymatic method (enzymatic kit urea-amonio, Boehringer Manheim).

The second test tried to evaluate the time and temperature storage influence in urea concentration, in red wine with an initial concentration of the 5 mg/L. Measurements were made using the colorimetric method once a week during 2 months.

The commercial used wines belong to 5 vineyards selected at random and for the second test was used a wine in develloping phase of 2003 grape harvest, wich was subjected to defferents temperatures to evaluate it's effect in urea concentration evolution.

The obtained results allow to point out that in the 15 red wines used, there are not high urea levels, what reduce the possibilities of carbamat of ethyl, differently one of five Late harvest wines which presented a bigger concentration at 3 mg/L.

In the case of the wines subjected to differents temperatures, it is clearly noticed a decrease in the concentration of urea in time, a big amount in the wine subjected to the highest temperature ( $37 \pm 1^{\circ} \text{C}$ ), what make probable the ethyl carbamate formation, because of the effect of this variable.

### Key words

Nitrogen compounds; Ethyl carbamate; Urea

## INTRODUCCIÓN

Los compuestos nitrogenados presentes tanto en el mosto como en el vino, provienen de las distintas partes de la uva y su principal característica es su gran variabilidad desde el punto de vista cuantitativo. Su importancia radica, básicamente, en el aporte nutritivo para levaduras y bacterias en el proceso de vinificación. Además, desempeñan un papel importante en el proceso de fermentación, clarificación y pueden influir, en menor grado, en el desarrollo de aromas y buqué del vino.

Sin embargo, estos compuestos debido a la misma actividad metabólica de los microorganismos pueden dar origen a ciertos agentes que son dañinos para la salud de los consumidores, es el caso del carbamato de etilo (CE), que precisamente resulta de la interacción de un compuesto nitrogenado importante, como es la urea, con el etanol formado durante la fermentación del mosto; su formación, además de la presencia de urea es función de variables como el tiempo y la temperatura.

Algunos estudios han demostrado que la mayor fracción de urea formada en los vinos durante la fermentación proviene de la degradación de arginina, uno de los aminoácidos más abundantes en los jugos de uva, sin embargo, existen otros factores que pueden interferir en su formación, por ejemplo: la fertilización nitrogenada del viñedo, la cepa de levadura y la aireación en el proceso fermentativo.

La urea fue utilizada por muchos años en todos los tipos de fermentaciones para complementar las necesidades de nitrógeno de las levaduras. Sin embargo, altas concentraciones de urea (superiores a 2 mg/L), favorecen la formación de CE, agente cancerígeno encontrado por investigadores canadienses, en cantidades importantes en los vinos de Jerez y de postre, en la década de los ochenta.

Es así, como diversos países han establecido límites en la concentración de CE presente en sus vinos; Canadá, por ejemplo, no tolera una concentración mayor a 30  $\mu\text{g/L}$  y Estados Unidos no permite concentraciones superiores a 15  $\mu\text{g/L}$ .

Considerando que la concentración de urea está directamente relacionada con la presencia de carbamato de etilo en los vinos y como no existe en Chile investigación al respecto, este estudio se plantea los siguientes objetivos:

- Determinar el contenido de urea en algunos vinos tintos y Late Harvest comerciales.
- Determinar el efecto de la temperatura y el tiempo, durante la evolución post-fermentativa, sobre la concentración de urea en un vino tinto.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Compuestos nitrogenados del mosto

Los mostos contienen una pequeña proporción de sustancias nitrogenadas (0,3 a 1,5 gramos de nitrógeno por litro), que son necesarias para la nutrición de las levaduras. Una parte de las sustancias nitrogenadas contenidas en los mostos es aprovechada por la levadura como alimento, y en una buena elaboración quedan separadas del vino, con la misma levadura, en el descube y primeros trasiegos. En consecuencia, en el vino son normalmente muy escasas las sustancias nitrogenadas, y la disminución de ellas se acentúa gradualmente durante la conservación y crianza (Marcilla, 1954).

Las materias nitrogenadas se encuentran en el mosto en forma de amoníaco y en forma orgánica, constituida por aminoácidos, polipéptidos y proteínas.

En el mosto y el vino se encuentran la mayoría de los 20 aminoácidos. La cantidad de cada uno de ellos depende de la variedad de uvas, del cultivo y de las técnicas de elaboración, siendo la prolina y la arginina los que se encuentran en concentraciones relativamente altas (Zoecklein *et al*, 2000).

El nitrógeno del amoníaco está presente en cantidades notables, aunque no siempre suficientes para una fermentación rápida; esta forma de nitrógeno es, en efecto, esencial para la buena marcha de la fermentación. El nitrógeno proteico está siempre presente: proviene del citoplasma (Ribéreau-Gayon *et al*, 1991).

### Compuestos nitrogenados del vino

Los compuestos nitrogenados del vino incluyen proteínas, polipéptidos, péptidos, aminoácidos, amidas y amoniaco (Zoecklein *et al*, 2000), siendo los polipéptidos la forma más importante del nitrógeno en los vinos (Aleixandre, 1999).

Las sustancias nitrogenadas tienen poca influencia sobre el sabor del vino, sin embargo, son importantes como sustancias nutritivas indispensables para las levaduras y las bacterias. Los vinos contienen de 1 a 3 g/L de sustancias nitrogenadas. Algunas de ellas pueden insolubilizarse y producir alteraciones en la conservación de los vinos blancos embotellados (Aleixandre, 1999), ya que los compuestos proteicos pueden dificultar la clarificación y la estabilidad de los vinos blancos de mesa (Zoecklein *et al*, 2000).

El contenido en nitrógeno total de un mosto de uva o de un vino se corresponde con la suma de diferentes fracciones nitrogenadas, aminoácidos libres, péptidos, proteínas, etc.

Algunas de estas fracciones, como los aminoácidos y las proteínas han sido objeto de numerosos trabajos; otros como los péptidos permanecen hoy prácticamente desconocidos, por lo tanto, es difícil hacer un balance exacto de los compuestos nitrogenados de un mosto de uva o de un vino y de apreciar totalmente el interés enológico.

El contenido nitrogenado del vino se modifica significativamente durante la fermentación maloláctica, ya que, las bacterias lácticas utilizan algunos aminoácidos como factores de crecimiento. Existen también los compuestos nitrogenados volátiles, los más abundantes en el vino son las acetamidas y sus aminas correspondientes. Estas no tienen influencia sobre el aroma ya que al pH del vino están protonadas y, por lo tanto, no volátiles. Como las levaduras producen pocas aminas, éstas provienen del mosto o de la fermentación maloláctica (Flanzy, 2000).

Otros compuestos nitrogenados del vino son las aminas, nitratos ( $\text{NO}_3$ ) y nitritos ( $\text{NO}_2$ ), estos últimos representan menos del 0,3% del nitrógeno total. Las aminas biogénicas, como histamina y tiramina, se forman por descarboxilación bacteriana a partir de los aminoácidos correspondientes (Zoecklein *et al*, 2000).

Los componentes del sabor que contienen nitrógeno son importantes en enología. Por ejemplo, el antranilato de metilo y la *o*-aminoacetofenona, se relacionan con el sabor acre y también se ha informado de que las 2-metoxipirazinas son responsables de los aromas herbáceos frecuentemente detectados en los vinos elaborados con Cabernet Sauvignon y Sauvignon Blanc (Zoecklein *et al*, 2000).

Las sales de amonio, que están de forma natural en el mosto y son eventualmente la forma de nitrógeno más rápida y completamente asimilada por las levaduras, al final se presentan en el vino a nivel de trazas: generalmente menos de 10 mg/L. Estas mismas sales se utilizan para suplementar los mostos deficitarios en nitrógeno, sin embargo, tales adiciones pueden aumentar la producción de urea (Monteiro y Bisson, 1991).

#### Origen y contenido de urea en los vinos

Los principales factores en la producción de urea parecen ser: cepa de levadura, exceso de arginina (con alta cantidad de aminoácidos totales) y aireación en el proceso fermentativo (Ough y Henschke, 1989).

Con respecto a la arginina, se ha establecido que junto con la prolina son los aminoácidos encontrados en mayor concentración en los jugos de uva; la arginasa de las levaduras cataliza la transformación de arginina a ornitina y urea (Monteiro *et al*, 1989) y considerando que la presencia de etanol inhibe el crecimiento de las levaduras, la captación de arginina disminuye, lo que reduce la formación de urea y su excreción al medio fermentativo. Así mismo, se ha comprobado que la adición de arginina al medio provoca

mayor excreción y menor reabsorción de urea, sin descontar que la levadura utilizada y la temperatura de fermentación constituyen factores importantes en la cantidad residual de urea presente en el vino terminado (Ough *et al*, 1988a; An y Ough, 1993).

Otra fuente importante de urea en los vinos es la degradación de las purinas, sin embargo, los niveles de purina son relativamente bajos en los jugos de uva, por consiguiente es improbable que estos compuestos se utilicen como fuentes de nitrógeno durante la vinificación (Monteiro *et al*, 1989). A pesar de esto, el origen de la urea a partir de la degradación de la purina no puede desconocerse, particularmente al final de la fermentación (Monteiro y Bisson, 1991a).

Mientras la prolina no puede degradarse en ausencia de oxígeno, la arginina es rápidamente utilizada como una fuente de nitrógeno durante las fermentaciones anaeróbicas (Monteiro y Bisson, 1991a).

Experimentos realizados por Henschke y Ough (1991), demostraron que la fase rápida de acumulación de urea coincide con el período de crecimiento de las levaduras y la fase de utilización con la fase estacionaria. Además, concluyeron que la adición de amonio y otros aminoácidos podrían impedir la absorción de arginina por la levadura, previniendo así la formación de urea.

En procesos no aireados las levaduras no pueden utilizar rápidamente la arginina y por lo tanto la formación de urea es escasa. En condiciones aeróbicas limitadas (aerobiosis inicial seguida por fermentación anaeróbica) se produce una acumulación rápida, pero la urea es solo utilizada parcialmente durante la última fase de fermentación, esto produce una concentración alta de urea en el vino terminado. Sólo concentraciones muy bajas de urea aumentan en el vino cuando los fermentos anaerobios son aireados durante la última fase de fermentación, éste puede ser el resultado de un estímulo pequeño a la actividad metabólica de las levaduras durante la última fase de fermentación (Henschke y Ough, 1991).

La concentración de urea en el vino tiene estrecha relación con el nivel de fertilización nitrogenada en el viñedo (Ough *et al.*, 1989; Ough *et al.*, 1990; Spayd *et al.*, 1991; Bertrand, 2000). Por tanto, se puede reducir la cantidad de urea formada en el vino, disminuyendo la fertilización, utilizando cepas de levadura que liberen menos urea y en vinos que se elaboran con adición de alcohol, encabezamiento cuando la concentración de urea es baja.

Sin embargo, reducir la concentración de urea inmediatamente después de la fermentación es probablemente la mejor solución para limitar la producción de CE (Zoecklein *et al.*, 2000).

La urea puede ser metabolizada por levaduras del género *Saccharomyces* vía urea carboxilasa y alofanato hidrolasa y formar amoniaco y anhídrido carbónico, o bien excretarse de la célula vía difusión facilitada (Figura 1), por tanto la concentración de urea encontrada en los vinos se debe a la excreción de ésta al medio fermentativo como consecuencia del metabolismo de las levaduras (Monteiro *et al.*, 1989).

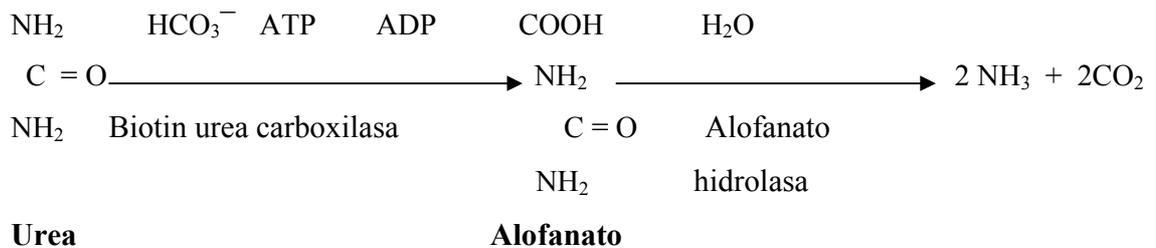


Figura 1. Degradación de la urea por *Saccharomyces cerevisiae* (Ough *et al.*, 1988b).

#### Formación de carbamato de etilo en los vinos

Se considera que la urea presente en el vino es el precursor principal del CE, también conocido como uretano (Ough y Trioli, 1988; Tegmo-Larsson y Henick-Kling, 1990;

Monteiro *et al*, 1989), éste ha demostrado ser un agente cancerígeno en animales de laboratorio (Ough, 1976; Ough *et al*, 1988a; Canas *et al*, 1989; Todoroki *et al*, 1990; Kodama *et al*, 1994; Whiton y Zoecklein, 2002), estudios indican que la dosis diaria tolerable para éstos animales es 1,5 mg/kg/día y para el hombre resultó ser de 0,3 µg/kg/día (Bertrand, 2000).

Existen otros precursores de CE en los vinos, como la citrulina (aminoácido presente en cantidades importantes en los jugos de uvas y vinos) y carbamil fosfato que pueden formar uretano en presencia de etanol (Ough *et al*, 1988b; Nagel y Weller, 1989; Ough *et al*, 1990; Ough *et al*, 1991; Sponholz, 1991; Liu *et al*, 1994).

La concentración de éste agente cancerígeno es dependiente de los niveles de urea, citrulina y etanol, así como del pH y la temperatura (Henschke y Ough, 1991). Sin embargo, trabajos posteriores realizados por Stevens y Ough (1993), demostraron que factores como el pH y tipo de vino no son significativos en su acumulación.

Estudios han demostrado que la urea es el principal precursor de CE que al reaccionar con el etanol lo produce durante el almacenamiento y crianza del vino. Otro componente que reacciona con el etanol para formar CE es la citrulina, la cual es formada por ciertas bacterias lácticas presentes en el vino, pero lo hace en un grado mucho menor que la urea (Ough *et al*, 1988b; Almy y Ough, 1989; Monteiro *et al*, 1989; Daudt *et al*, 1992; Stevens y Ough, 1993 y Liu *et al*, 1994). Por lo tanto la cantidad potencial de CE depende principalmente de las condiciones, el tiempo de almacenamiento y de la concentración de urea presente en los vinos (Ough *et al*, 1990). Bertrand (2000), indica que el CE potencial, podría aumentar en un 35% calentando el vino a 70°C por 72 horas y que vinos con concentraciones de urea mayores a 2 mg/L pueden llegar a tener hasta 20 µg/L de CE después de 5 años de envejecimiento.

### Determinación de urea en los vinos

Los métodos más usados para la medición de urea en los vinos, son el método químico, Almy y Ough (1989) y el método enzimático. Ambos métodos han resultado confiables y precisos, sin embargo, el método enzimático a pesar de ser mucho más simple y rápido presenta costos más elevados, a diferencia del método químico que si bien es más engorroso, es de menos costo. Por último el método enzimático se recomienda para vinos blancos, ya que, los vinos tintos poseen macromoléculas que pueden interferir en la reacción enzimática, a pesar que el carbón activado elimina muchos compuestos fenólicos, los resultados obtenidos son poco satisfactorios (Bertrand, 2000).

#### Método químico

Principio. La urea se fija en una resina intercambiadora de cationes, se desorbe mediante una solución de cloruro de sodio acidificada con ácido clorhídrico. Enseguida la urea se hace reaccionar con 1-fenil-1,2-propanodiona-2-oxima en medio ácido. El cromóforo producto de la reacción se mide a una longitud de onda de 540 nm, la absorbancia determinada es proporcional a la concentración de urea presente en el vino (Almy y Ough, 1989).

#### Método enzimático

Principio. La urea se hidroliza en amoníaco y dióxido de carbono en presencia de la enzima ureasa (Figura 2).



Una molécula de urea se degrada en dos moléculas de amoníaco y en una molécula de dióxido de carbono. La reacción entre el amoníaco, el 2-oxoglutarato y el NADH es estequiométrica. Por consiguiente cuando una molécula de urea reacciona, dos moléculas de NADH se oxidan. Para conocer las concentraciones de urea y amoníaco, es suficiente conocer la cantidad de NADH oxidado. Por esto el NADH es medido a partir de la lectura de absorbancia que es máxima a 365 nm (Bertrand, 2000).

## **MATERIALES Y METODO**

Todos los análisis y ensayos de esta investigación fueron realizados en los laboratorios del Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

### Materiales

Este estudio está constituido por dos ensayos independientes, concordantes con los objetivos de este estudio. Para el primer ensayo se utilizaron 5 vinos comerciales de cada una de las siguientes cepas: Cabernet Sauvignon, Carménère, Merlot y además 5 vinos Late Harvest. Para el segundo ensayo, se trabajó con vino Cabernet Sauvignon correspondiente a la vendimia 2003.

Se utilizó una resina intercambiadora de cationes (Dowex 50 wx 8, 50-100 mesh), el reactivo 1-fenil-1,2-propanodiona-2-oxima (Aldrich) también conocido como  $\alpha$ -isinitrosopropiofenona, un Kit enzimático (Boehringer Mannheim), un espectrofotómetro Helius Gamma y dos estufas termorreguladas.

### Método

#### Primer ensayo

La presencia de urea en los vinos tintos se evaluó utilizando el método colorimétrico propuesto por Almy y Ough (1989), en el que la urea se fija en la resina y luego reacciona con el 1-fenil-1,2-propanodiona-2-oxima, en medio ácido, para luego determinar su

absorbancia a 540 nm. Se utilizó este método, pues los pigmentos antociánicos interfieren en la determinación enzimática.

La puesta a punto del método colorimétrico se realizó utilizando soluciones patrones con distintas concentraciones de urea (0, 1, 2, 4, 6 y 9 mg/L), con el fin de determinar la recuperación de urea luego de su paso por la resina. Para determinar la sensibilidad y reproducibilidad del método se analizaron colorimétricamente eluatos provenientes de columnas de resina nuevas y reutilizadas.

Para determinar la presencia de urea en vinos Late Harvest se utilizó el método enzimático que junto al método colorimétrico están descritos en la revisión bibliográfica (Bertrand, 2000).

### Segundo ensayo

Para determinar la influencia de la temperatura, durante la evolución post-fermentativa del vino, sobre la concentración de urea en el vino variedad Cabernet Sauvignon, se partió ajustando la concentración de urea a 5 mg/L.

El vino fue sometido a tres condiciones de temperatura y en cada una de ellas se mantuvo por un tiempo de 60 días. La primera correspondió a temperatura ambiente  $17 \pm 1^\circ \text{C}$  y fue el testigo de este ensayo, las otras fueron  $30 \pm 1^\circ \text{C}$  y  $37 \pm 1^\circ \text{C}$ , estas condiciones corresponden a los tratamientos 1, 2 y 3 respectivamente.

Para evaluar la incidencia del tiempo sobre la concentración de urea se tomaron muestras semanales de los vinos sometidos a cada una de las tres temperaturas, determinando la concentración de urea mediante el método colorimétrico.

Con los datos obtenidos se trazaron curvas de evolución y se aplicó análisis estadístico a los datos de cada fecha de análisis para determinar las posibles diferencias en respuesta al efecto de la temperatura.

#### Diseño experimental y análisis estadístico

Para el primer ensayo se utilizaron tres muestras, de cada uno de los 20 vinos comerciales.

Para el segundo ensayo se utilizó un diseño completamente aleatorizado, constituido por tres tratamientos correspondientes a cada una de las temperaturas, cada uno de ellos constó de tres repeticiones.

Los resultados obtenidos se analizaron por ANDEVA (análisis de varianza) y cuando existan diferencias significativas se utilizó la prueba de rango múltiple de Duncan.

La unidad experimental correspondió a envases (botellas) de 750 mL para los vinos comerciales, 500 mL para los vinos Late Harvest y botellas de 200 mL para el vino Cabernet Sauvignon vendimia 2003.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados entregados por este estudio, para cada uno de los ensayos se presentan cuadros y gráficos que permiten observar y entender mejor los resultados obtenidos.

### Primer ensayo

#### Calibración del método

La primera etapa de trabajo con el método colorimétrico consistió en hacer la calibración de éste, usando concentraciones de urea conocidas en solución hidroalcohólica 10% en volumen (Bertrand, 2000). Luego de un elevado número de mediciones considerando factores como resinas nuevas, usadas por segunda y tercera vez y velocidad de paso a través de la resina, finalmente se obtuvo la curva que se presenta en la figura 4, con la cual se logró la repetitividad necesaria para obtener resultados fiables.

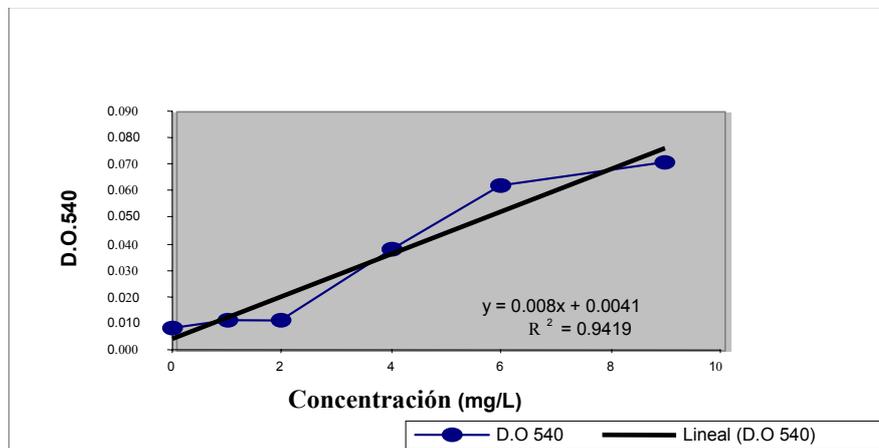


Figura 4. Curva de calibración método colorimétrico.

Como se observa en la figura 4, el coeficiente de correlación obtenido es de 0,9419 lo que resulta bastante satisfactorio y confiable al momento de utilizar la ecuación obtenida de la curva.

Bertrand (2000), logró con 5 puntos una curva con un coeficiente de correlación de 0,998. Al repetir el análisis con cinco muestras independientes de un mismo vino tinto, obtuvo un coeficiente de variación de 3,3%. Por consiguiente afirma que éste método es fiable y preciso. Para el caso de este ensayo, utilizando cinco muestras de un mismo vino tinto se obtuvo un coeficiente de variación de un 9,8%.

#### Determinación de urea en vinos comerciales

Los resultados que se presentan a continuación (cuadro 1) corresponden a la media de tres determinaciones aplicadas a cada uno de los vinos, la concentración correspondiente a la absorbancia se calculó de acuerdo a la curva de calibrado presentada anteriormente en la figura 4.

Cuadro 1. Concentración de urea en vinos tintos varietales.

| Cepa                   | Urea (mg/L) | Cepa          | Urea (mg/L) |
|------------------------|-------------|---------------|-------------|
| Cabernet Sauvignon (1) | 1,24        | Merlot (4)    | 1,24        |
| Cabernet Sauvignon (2) | 1,49        | Merlot (5)    | 1,30        |
| Cabernet Sauvignon (3) | 1,49        | Carménère (1) | 1,30        |
| Cabernet Sauvignon (4) | 1,36        | Carménère (2) | 1,98        |
| Cabernet Sauvignon (5) | 1,74        | Carménère (3) | 1,74        |
| Merlot (1)             | 1,86        | Carménère (4) | 1,44        |
| Merlot (2)             | 1,36        | Carménère (5) | 1,74        |
| Merlot (3)             | 1,49        |               |             |

Como se muestra en el cuadro 1, las concentraciones de urea en estos vinos comerciales chilenos no superaron los 2 mg/L, por lo tanto la posibilidad de formación de CE, agente cancerígeno dependiente de los niveles de urea (Henschke y Ough, 1991) en el tiempo es bajísima.

Trabajos realizados por Ingargiola *et al.* (1990) a 67 vinos comerciales seleccionados al azar, varietales y no varietales de los estados de California y Washington en los Estados Unidos, 5 presentaron concentraciones mayores o iguales a 5 mg/L de urea y más del 70% niveles menores o iguales a los 2 mg/L.

Al analizar estadísticamente los 15 vinos, con el fin de determinar si existía diferencia entre las tres cepas, se obtuvieron los resultados que se presentan en el cuadro 2.

Cuadro 2. Concentración de urea (mg/L).

| <i>Concentración promedio (mg/L)</i> |        |           |
|--------------------------------------|--------|-----------|
| Cabernet Sauvignon                   | Merlot | Carménère |
| 1,47 a                               | 1,45 a | 1,64 a    |

Letras iguales no presentan diferencia significativa a un nivel de significancia del 5%.

El cuadro muestra que según el análisis estadístico no existe diferencia significativa a un nivel del 5% entre las cepas.

Considerando trabajos realizados por Ingargiola (1992) citado por Bertrand (2002), se señala que 1 mg de urea es responsable de la formación de 2 µg/L de CE. Según estos antecedentes las concentraciones potenciales para los vinos tintos de este ensayo deberían estar entre 2,9 µg/L y 3,28 µg/L de CE.

La urea está presente en los vinos comerciales entre 0 y 3 mg/L; sin embargo, los métodos analíticos son sensibles a 1 mg/L (Fujinawa *et al.*, 1992; Nagel y Weller, 1989).

Por otra parte, Kodama (1996), postula que el contenido de urea en vino debe estar bajo los 2 mg/L para controlar la formación de CE durante el envejecimiento y almacenaje del mismo.

#### Determinación de urea en vinos Late Harvest.

La concentración de urea se obtuvo usando el método enzimático (Kit de Boehringer Mannheim). Para asegurar los resultados se midió la concentración de urea tres veces a cada uno de los vinos, no existiendo diferencias significativas entre las muestras. Los resultados se presentan en el cuadro 3.

Cuadro 3. Concentración promedio de urea en vinos Late Harvest.

| Cepa                    | Viña            | Año  | Urea (mg/L) |
|-------------------------|-----------------|------|-------------|
| Semillón                | Carmen          | 2001 | 1,352 a     |
| Moscatel de Alejandría  | Fco. de Aguirre | 2002 | 1,062 b     |
| S.Blanc/Gewurtztraminer | Tarapacá        | 2003 | 3,332 c     |
| Chardonnay/Viognier     | Santa Rita      | 2002 | 1,256 ab    |
| Moscatel de Alejandría  | Las Lomas       | 2002 | 0,362 d     |

Letras iguales no presentan diferencia significativa a un nivel de significancia del 5%.

Como se muestra en el cuadro 3 las concentraciones de urea obtenidas a partir de las tres repeticiones de cada uno de los vinos Late Harvest, cuatro de los vinos analizados presentaron concentraciones bajo los 2 mg/L, por lo tanto la formación de CE durante el posible envejecimiento y almacenaje de estos vinos estaría controlado (Kodama, 1996), sin embargo, el correspondiente a la viña Tarapacá presentó un valor promedio superior a los 3 mg/L por lo cual existe la posibilidad de formación de CE si este vino fuera consumido en un período superior a 5 años (Bertrand, 2000). Esto puede deberse a los insumos enológicos usados, pues es sabido que las sales de amonio, usadas frecuentemente en vinificación pueden aumentar la producción de urea (Monteiro y Bisson, 1991), el tipo de levadura

(Ough y Henschke, 1989) al sector dentro del valle al que pertenecen cada una de las viñas, a los distintos valles, al nivel de fertilización del viñedo (Ough *et al*, 1989; Ough *et al*, 1990; Spayd *et al*, 1991; Bertrand, 2000) y por supuesto al criterio del enólogo. Además es importante agregar que el proceso fermentativo de estos vinos resulta bastante laborioso, considerando que la acción del hongo *Botrytis cinerea* sobre las bayas modifica profundamente la composición química del mosto, y por lo tanto del vino; por lo que se recomienda la adición de levaduras, fosfato de amonio y tiamina con el fin de estimular la fermentación (Flanzy, 2000).

#### Segundo ensayo

En el cuadro 4 se muestran los resultados obtenidos una vez que se determinó la concentración de urea en vino Cabernet Sauvignon cosecha 2003, las mediciones se realizaron semanalmente para observar la evolución en la concentración de urea según los distintos tratamientos. El tratamiento T1 corresponde a temperatura ambiente,  $17\pm 1^\circ\text{C}$ . Se comenzó ajustando la concentración de urea a 5,14 mg/L, lo que corresponde a la primera fecha de análisis según cuadro 4.

Como se observa, en la segunda fecha, a los 7 días de almacenamiento, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos 1 y 2 pero sí entre éstos y el tratamiento 3. Esto podría deberse al poco tiempo de almacenamiento de los vinos.

Cuadro 4. Fechas de análisis

|                   | Urea (mg/L) |           |           |
|-------------------|-------------|-----------|-----------|
|                   | T1 (17°C)   | T2 (30°C) | T3 (37°C) |
| 08 octubre 2003   | 5,14 a      | 5,14 a    | 5,14 a    |
| 15 octubre 2003   | 5,14 a      | 5,08 ab   | 4,69 c    |
| 22 octubre 2003   | 5,14 a      | 4,99 b    | 4,41 c    |
| 29 octubre 2003   | 5,20 a      | 4,93 b    | 4,39 c    |
| 05 noviembre 2003 | 5,14 a      | 4,89 b    | 4,37 c    |
| 12 noviembre 2003 | 5,13 a      | 4,82 b    | 4,29 c    |
| 19 noviembre 2003 | 5,12 a      | 4,80 b    | 4,29 c    |

|                   |        |        |        |
|-------------------|--------|--------|--------|
| 26 noviembre 2003 | 5,13 a | 4,79 b | 4,26 c |
| 04 diciembre 2003 | 5,11 a | 4,76 b | 4,22 c |

Letras iguales no presentan diferencia significativa a un nivel de significancia del 5%.

En la tercera fecha de análisis, a los 14 días de almacenamiento, se presentaron diferencias significativas entre todos los tratamientos, por lo que comienza a manifestarse el efecto de la temperatura en cada uno de los vinos, pues se percibe una leve disminución en la concentración de urea presumiblemente por efecto de esta variable.

En los análisis realizados a los 21 días de almacenamiento, se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos 1, 2 y 3, con una disminución importante en la concentración de urea en los tratamientos 2 y 3 con respecto a la primera fecha de análisis.

Los resultados obtenidos a los 28 días de almacenamiento muestran diferencias significativas entre los tres tratamientos, lo que manifiesta la importancia de la temperatura en la concentración de urea en bebidas alcohólicas (Henschke y Ough, 1991; Bertrand, 2000).

Los análisis realizados el 12 de noviembre señalan diferencias significativas a un nivel de significancia del 5% entre los tres tratamientos, por lo que a las cinco semanas de haber comenzado la evaluación la concentración de urea en los vinos ha disminuido en los tratamientos 2 y 3, mientras que a esta fecha la concentración de urea en el tratamiento 1 se ha mantenido sin grandes variaciones.

Los resultados obtenidos a los 42 días de almacenamiento, muestran que el tratamiento 3 presenta menor concentración de urea con respecto a los tratamientos 1 y 2, y es precisamente éste el que representa la mayor temperatura de almacenaje.

Para el día 26 de noviembre la tendencia que se ha manifestado es una disminución en la concentración de urea en el tratamiento 2, una disminución más significativa en el tratamiento 3 y niveles de urea prácticamente constantes en el tratamiento 1.

Ya en la octava fecha de análisis, a los 56 días de almacenamiento, se puede apreciar una disminución importante en la concentración de urea sobre todo en el tratamiento 3 con respecto a la fecha de inicio de las mediciones, por lo que el tiempo de almacenamiento resulta ser una variable importante, dependiendo de la temperatura, en la disminución de la concentración de urea.

Como se aprecia en la figura 5, el tratamiento 1 tiende a mantener la concentración de urea en el tiempo, sin embargo los tratamientos 2 y 3 muestran una disminución en la concentración de urea, principalmente el tratamiento 3, el que coincide con una mayor temperatura de almacenaje.

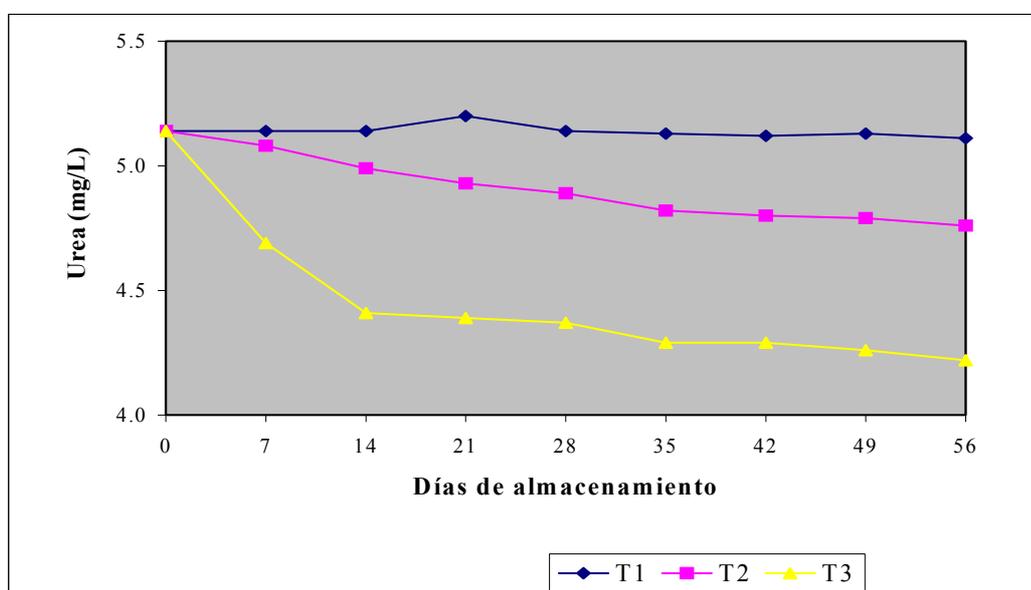


Figura 5. Curvas de evolución de urea por efecto de la temperatura de almacenamiento.

En un estudio realizado por Stevens y Ough (1993) en vinos comerciales del valle de Napa, California, Estados Unidos (482 vinos), sometidos a temperaturas entre 13 y 24 ° C, determinaron una concentración promedio de 2,84 mg/L de urea, sin embargo, los niveles de urea disminuyeron con el tiempo. Ellos estimaron que una fracción de la pérdida de urea se debió a la formación de CE.

Resultados presentados por Kodama *et al.* (1994) demuestran que una cantidad importante de CE puede formarse por concentraciones bajas de urea (2,7 mg/L) durante el almacenamiento de los vinos, sin importar la variedad de éstos y en este sentido considera la temperatura de almacenamiento como una variable importante. Nuestros datos confirman lo anterior, ya que, hubo un 0,59% de descenso en la concentración de urea en el tratamiento 1 (17° C), un 7,39% para el tratamiento 2 (30° C) y un 17,89% de disminución para el tratamiento 3 (37° C), lo que responde a la formación potencial de CE.

## CONCLUSIONES

- La repetitividad lograda en los dos métodos usados permite considerarlos como métodos fiables y precisos para medir la concentración de urea en vinos.
- La concentración de urea en vinos tintos comerciales de las tres variedades (Cabernet Sauvignon, Merlot, Carménère) estudiadas fue inferior a los 3 mg/L, por lo tanto, se estima que la posibilidad de formación potencial de carbamato de etilo es baja.
- Los vinos Late Harvest, en general presentaron concentraciones aceptables de urea a excepción de uno de ellos, pero en general, la posibilidad de formación potencial de carbamato de etilo es escasa.
- El efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento son determinantes en la disminución de la concentración de urea y sería interesante determinar la concentración de carbamato de etilo formada a expensas de dicha disminución.

## LITERATURA CITADA

ALEIXANDRE, J. L. 1999. Vinos y bebidas alcohólicas. Servicio de publicaciones, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia. España. 498 p.

ALMY, J. y OUGH, C. S. 1989. Urea analysis for wines: A Review. J. Agric. Food. Chem. (37): 968-970.

AN, D. y OUGH, C. S. 1993. Urea excretion and uptake by wine yeast as affected by various factors: A Review. Am. J. Enol. Vitic. 44 (1): 35-40.

BERTRAND, A. 2000. Produits de traitement et auxiliaires d'élaboration des moust et des vins. Editons Feret. Paris, Francia. p 171-192.

CANAS, B. J.; HAVERY, D. C.; ROBINSON, L. R.; SULLIVAN, M. P.; JOE, F. L. y DIACHENKO, G. W. 1989. Ethyl carbamate levels in selected fermented foods and beverages: A Review. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 72 (6): 873-876.

DAUDT, C.; OUGH, C. S.; STEVENS, D. y HERRAIZ, T. 1992. Investigations into ethyl carbamate, *n*-propyl carbamate, and urea in fortified wines: A Review. Am. J. Enol. Vitic. 43 (4): 318-322.

FLANZY, C. 2000. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. AMV Ediciones, Mundi Prensa. Madrid. España. 782 p.

FUJINAWA, S.; BURNS, G. y DE LA TEJA, P. 1990. Application of acid urease to reduction of urea in commercial wines: A Review. Am. J. Enol. Vitic. 41 (4): 350-354.

FUJINAWA, S.; TODOROKI, H.; OHASHI, N. y TERASAKI, M. 1990. Application of an acid urease to wine: Determination of trace urea in wine: A Review. *Journal of Food Science*. 55 (4): 1018-1022.

FUJINAWA, S.; KODAMA, S.; TODOROKI, H. y SUZUKI, T. 1992. Trace urea determination in red wine and its degradation rate by acid ureasa: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 43 (4): 362-366.

HENSCHKE, P. A. y OUGH, C. S. 1991. Urea acumulation in fermenting grape juice: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 42 (4): 317-321.

KODAMA, S.; SUZUKI, T.; FUJINAWA, S.; DE LA TEJA, P. y YOTSUZUKA, F. 1994. Urea contribution to ethyl carbamate formation in commercial wines during storage: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 45 (1): 17-24.

KODAMA, S. 1996. Optimal conditions for effective use of acid ureasa in wine: A Review. *Journal of Food Science*. 61 (3): 548-552.

LIU, S.; PRITCHARD, G. G.; HARDMAN, M. J. Y PILONE, G. J. 1994. Citrulline production and ethyl carbamate (Urethane) precursor formation from arginine degradation by wine lactic acid bacteria *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus buchneri*: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 45 (2): 235-242.

MARCILLA, J. 1954. Tratado práctico de viticultura y enología españolas. Tomo II. Sociedad Anónima Española de Traductores y Autores. Madrid. España. 517 p.

MONTEIRO, F. F. y BISSON, L. F. 1991a. Amino acid utilization and urea formation during vinification fermentations: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 42 (3): 199-208.

MONTEIRO, F. F. y BISSON, L. F. 1991b. Biological assay of nitrogen content of grape juice and prediction of sluggish fermentations: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 42 (1): 47-57.

MONTEIRO, F. F.; TROUSDALE, E. K y BISSON, L. F. 1989. Ethyl carbamate formation in wine: Use of radioactively labeled precursors to demonstrate the involvement of urea: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 40 (1): 1-8.

NAGEL, C. W. y WELLER, K. M. 1989. Colorimetric determination of urea in wine: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 40 (2): 143-144.

OUGH, C. S. 1976. Ethyl carbamate in fermented beverages and foods. I. Naturally occurring ethyl carbamate: A Review. *J. Agric. Food. Chem.* 24 (2): 323-327.

OUGH, C. S.; CROWELL, E. A. y GUTLOVE, B. R. 1988a. Carbamyl compound reactions with ethanol: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 39 (3): 239-242.

OUGH, C. S.; CROWELL, E. A. y MOONEY, L. A. 1988b. Formation of ethyl carbamate precursors during grape juice (Chardonnay) fermentation. I. Addition of amino acids, urea, and ammonia: Effects of fortification on intracellular and extracellular precursors: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 39 (3): 243-249.

OUGH, C. S. y HENSCHKE, P. A. 1989. Letter to the editor: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 40 (2).

OUGH, C. S.; HUANG, Z. y STEVENS, D. 1991. Amino acid uptake by four commercial yeast at two different temperatures of growth and fermentation: effects on urea excretion and reabsorption: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 42 (1): 26-40.

OUGH, C. S.; STEVENS, D. y ALMY, J. 1989. Preliminary comments on effects of grape vineyard nitrogen fertilization on the subsequent ethyl carbamate formation in wines: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 40 (3): 219-220.

OUGH, C. S.; STEVENS, D.; SENDOVSKI, T.; HUANG, Z. y AN, D. 1990. Factors contributing to urea formation in commercially fermented wines: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 41 (1): 68-73.

OUGH, C. S. y TRIOLI, G. 1988. Urea removal from wine by an acid ureasa: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 39 (4): 303-307.

RIBEREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E.; RIBEREAU-GAYON, P. y SUDRAUD, P. 1991. *Tratado de Enología. Ciencias y técnicas del vino. Tomo II* Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires. Argentina. 537 p.

SPAYD, S. E.; WAMPLE, R. L.; NAGEL, C. W.; STEVENS, R. G. y EVANS, R. G. 1991. Vineyard nitrogen fertilization effects on must and wine composition and quality, p. 196-198. *In: International symposium on nitrogen in grapes and wines.* J. M. Rantz (Ed). Am. Soc. Enol. Vitic., California, Estados Unidos. 340 p.

SPONHOLZ, W. R. 1991. Nitrogen compounds in grapes, must and wine, p. 67-75. *In: International symposium on nitrogen in grapes and wines.* J. M. Rantz (Ed). Am. Soc. Enol. Vitic., California, Estados Unidos. 340 p.

STEVENS, D. F. y OUGH, C. S. 1993. Ethyl carbamate formation: Reaction of urea and citrulline with ethanol in wine under low to normal temperature conditions: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 44 (3): 309-312.

TEGMO-LARSSON, I. M. y HENICK-KLING, T. 1990. Ethyl carbamate precursors in grape juice and the efficiency of acid ureasa on their removal: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 41 (3): 189-192.

TODOROKI, H.; FUJINAWA, S.; OHASHI, N.; TODA, J. y TERASAKI, M. 1990. Application of an acid urease to wine: determination of trace urea in wine: A Review. *Journal of Food Science.* 55 (4): 1018-1022.

WITHON, R. S. y ZOECKLEIN, B. 2002. Determination of ethyl carbamate in wine by solid-phase microextraction and gas chromatography/ mass spectrometry: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 53 (1): 60-63.

ZOECKLEIN, B.; FUGELSANG, K.; GUMP, B. y NURY, F. 2000. *Análisis y producción de vinos.* Editorial Acribia. Zaragoza. España. 613 p.