

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

**MEMORIA DE TÍTULO**

**pH DURANTE LA INTERACCIÓN DE VINOS COMERCIALES CON SALIVA  
HUMANA**

**VALERIA PAZ ESPÍNOLA ESPÍNOLA**

**SANTIAGO- CHILE**

**2012**

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

**MEMORIA DE TÍTULO**

**pH DURANTE LA INTERACCIÓN DE VINOS COMERCIALES CON SALIVA  
HUMANA**

**pH DURING THE INTERACTION BETWEEN COMMERCIAL WINES AND  
HUMAN SALIVA**

**VALERIA PAZ ESPÍNOLA ESPÍNOLA**

**SANTIAGO- CHILE**

**2012**

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

**pH DURANTE LA INTERACCIÓN DE VINOS COMERCIALES CON SALIVA  
HUMANA**

Memoria para optar al título profesional de:  
Ingeniera Agrónoma

**VALERIA PAZ ESPÍNOLA ESPÍNOLA**

PROFESORES GUÍAS	CALIFICACIONES
Sr. Elías Obreque-Slier Ingeniero Agrónomo, Enólogo, Dr.	6,8
Sr. Remigio López Solís Bioquímico, Dr.	7,0
<b>PROFESORES EVALUADORES</b>	
Sr. Álvaro Peña Neira Ingeniero Agrónomo, Enólogo, Dr	7,0
Sr. Marcos Mora González Ingeniero Agrónomo, Dr.	7,0

**SANTIAGO, CHILE**

**2012**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de este trabajo.

A mi familia, en especial a mi mamá Jeannette por su apoyo incondicional, por todo el cariño que me entrega cada día y por ser el motor de mi vida.

A Cristóbal Parry por todos sus consejos, ayuda, cariño y por ser mi compañero en los buenos y malos momentos.

A mis profesores guías Remigio López y Elías Obreque por la orientación, dedicación, cariño y apoyo que me han entregado durante todo este proceso.

A mis amigas y amigos, en especial a Karol y Lorena por haber formado parte de esta etapa, por todo su cariño y su amistad.

A Héctor Morales por su buena disposición y por toda la ayuda que me brindó.

Para finalizar, agradecer al Proyecto FONDECYT 1110832 “Influence of both polysaccharides, anthocyanins and some technological aspects on the astringency and mouth-feel quality of chilean wines” por financiar esta Memoria.

## ÍNDICE

	Páginas
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
Palabras claves	1
<b>SUMMARY</b>	<b>2</b>
Key words	2
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
Objetivo	4
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>5</b>
Lugar de estudio	5
Materiales	5
Saliva humana y vinos	5
Equipamiento y reactivos	5
Métodos	6
Procedimiento	6
Obtención de saliva	6
Medición del pH	6
Efecto de la saliva sobre el pH de los vinos	6
Caracterización química de los vinos del estudio	8
Diseño experimental	9
Análisis estadístico	9
<b>RESULTADOS</b>	<b>10</b>
Caracterización química de los vinos del estudio	10
pH tras la interacción de vino con saliva humana	11
Ensayo <i>in vitro</i>	11
Efecto de las salivas de distintos individuos sobre el pH del vino	16
Ensayo <i>in vivo</i>	17
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>19</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>23</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>24</b>
<b>APÉNDICE</b>	<b>28</b>
Apéndice I	28
Apéndice II	33
Apéndice III	38

## RESUMEN

El vino es el producto obtenido por fermentación alcohólica de mosto de uva (especie *Vitis vinífera* L.). Su composición es acídica, con valores de pH que se encuentran normalmente entre 2,8 y 3,8. Entre los constituyentes que aportan a su acidez se encuentran los ácidos orgánicos provenientes de las uvas (ácidos tartárico, málico y cítrico) y de los fenómenos fermentativos (ácidos succínico, láctico y acético).

Bajo condiciones de degustación el vino se mezcla con la saliva en la boca, lo que permite la percepción gustativa. La saliva es una mezcla de secreciones exocrinas de alta complejidad, que cumple importantes funciones. Una de éstas es la capacidad tamponante, que se refiere a su capacidad para contrarrestar los cambios de pH en la boca producidos por los alimentos.

En este estudio se evaluó el efecto de la saliva humana sobre el pH del vino (tinto y blanco) mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. Para ello se empleó un vino blanco del cv. Sauvignon blanc con pH de 3,4 y un vino tinto del cv. Cabernet sauvignon con pH de 3,8.

En condiciones *in vitro* se observó que la adición de 280  $\mu$ L y 150  $\mu$ L de vino tinto y blanco, respectivamente, fueron suficientes para producir una disminución significativa del pH de 3 mL saliva y la superación de su capacidad tamponante. Asimismo, la adición desde 350  $\mu$ L de vino tinto o blanco fueron suficientes para que la mezcla saliva-vino alcanzase un pH similar al del vino. En condiciones *in vivo*, la adición de 1,5 mL de vino blanco o tinto fue suficiente para provocar una disminución significativa del pH de la saliva y la pérdida de su capacidad tamponante. Asimismo, la incorporación de 3 mL de vino tinto ó 6 mL de vino blanco en la boca, redujeron el pH de la mezcla saliva-vino hasta el pH del vino correspondiente.

Sobre la base de estas observaciones, es posible concluir que en una evaluación sensorial normal, la degustación de 10 a 15 mL de vino genera la pérdida total de la capacidad tamponante de la saliva y el vino mantiene en boca su pH original.

### Palabras claves

pH del vino; saliva; capacidad tamponante; ácidos orgánicos; degustación.

## ABSTRACT

Wine is the resulting product of alcoholic fermentation of grape must (*Vitis vinifera* L.). Wine is acidic with pH in the range from 2,8 to 3,8. Among the main wine constituents contributing to its acidity are the organic acids derived from grapes (tartaric, malic and citric acids) and from fermentation (succinic, lactic and acetic acids).

During degustation, wine becomes mixed with saliva in the mouth. This is critical for taste perception. Saliva itself is a mix of highly complex exocrine secretions displaying a diversity of functions. One of these is its buffering capacity, that is, its ability to counteract pH changes produced by the presence of meals in the mouth.

The aim of this study was to assess the effect of human saliva on the pH of red and white wines by means of *in vitro* and *in vivo* assays.

*In vitro* experiments showed that the addition of either 280  $\mu$ L of red wine or 150  $\mu$ L of white wine produced a significant decrease in the pH of a 3 mL aliquot of saliva. Also, the addition of 350  $\mu$ L of wine was sufficient to produce a wine-saliva mix with a pH around that of the corresponding wine. *In vivo* experiments the placing of 1,5 mL of wine produced a significant decrease in the pH. Likewise, placing in mouth 3 mL of red wine or 6 mL of white wine lowered the pH of the wine-saliva mix to the pH level of the corresponding wine.

On these grounds we concluded that during a standard sensory assessment of wine, volumes of 10-15 mL of wine overcome the buffer capacity of saliva and the pH of the wine-saliva mix in the mouth is that of the corresponding wine.

### Key words

Wine pH; saliva; buffer capacity; organic acids; tasting.

## INTRODUCCIÓN

El vino es el producto obtenido principalmente por fermentación alcohólica de mosto de uva (*Vitis vinifera* L.). Está constituido principalmente por agua, alcoholes, azúcares, compuestos fenólicos, azufrados, nitrogenados y aromáticos, elementos minerales, ésteres y ácidos. Tiene una composición ácida con valores normales de pH entre 2,8 y 3,8 (Hidalgo, 2003). Dentro de los constituyentes que aportan a la acidez del vino se encuentran los ácidos orgánicos provenientes de las uvas (esencialmente de la pulpa de las bayas) y de los fenómenos fermentativos (Flanzy, 2000; Mato *et al.*, 2005). Estos ácidos corresponden mayormente a los ácidos tartárico, málico, cítrico, succínico, láctico y acético. La concentración de ácidos orgánicos y la relación ácido málico/ácido tartárico determinan los valores de pH de la baya y del mosto producido a partir de ellas.

El pH es fundamental para la estabilidad microbiológica del vino, crecimiento de las levaduras responsables del proceso fermentativo, estabilidad del color, potencial sensorial y funcionamiento de fermentación maloláctica, entre otros. Una disminución de la acidez se traduce en un vino con falta de brillo, menor aromaticidad, gusto plano y mayor fragilidad desde el punto de vista microbiológico. Por otro lado, los ácidos orgánicos del vino otorgan a éste una capacidad tamponante, la que es más elevada cuanto mayor sea su contenido en ácidos débiles. Este efecto será máximo en los vinos cuyo pH sea cercano al pK del principal de los ácidos presentes, como es el ácido tartárico (Flanzy, 2000).

Bajo condiciones de degustación, en la boca el vino se mezcla con la saliva, permitiendo la percepción gustativa debido a la interacción fisicoquímica entre las moléculas presentes en el vino con los receptores orales. La saliva presente en la boca (denominada saliva entera, saliva mixta o saliva total), es una mezcla de secreciones exocrinas de alta complejidad, líquida, incolora, sin olor ni sabor, de viscosidad variable, constituida principalmente por agua (99,5%), proteínas (0,3%) y sustancias inorgánicas (0,2%) (Humphrey y Williamson, 2001; Van Nieuw Amerongen *et al.*, 2004). La fracción proteica de la saliva (200-300 mg/100 mL) está constituida principalmente por glicoproteínas, enzimas (tales como  $\alpha$ -amilasa y anhidrasa carbónica), inmunoglobulinas y un amplio rango de péptidos (cistatinas, estaterina, histatinas y proteínas ricas en prolina) con actividad antimicrobiana (Humphrey y Williamson, 2001; Van Nieuw Amerongen *et al.*, 2004; De Smet y Contreras, 2005). La fracción inorgánica de la saliva contiene los electrolitos usuales de un fluido corporal típico (iones sodio, potasio, cloro y bicarbonato) pero con concentraciones diferenciales, que caracterizan a la saliva como un fluido hipotónico (Schipper *et al.*, 2007). Los constituyentes de la saliva cumplen importantes funciones, las cuales se pueden clasificar en cinco grandes categorías que sirven para mantener la salud oral y crear un equilibrio ecológico adecuado. Estas son: lubricación y protección; acción tampón y de limpieza; mantenimiento integral de la dentadura; actividad antimicrobiana y participación en la percepción y digestión de los alimentos (Moss, 1995 y Mandel, 1987; citados por Humphrey y Williamson, 2001). El agua salival permite que los alimentos se disuelvan y se

perciban sus sabores. Por su parte, el mucus lubrica el bolo alimenticio para facilitar la deglución y avance a lo largo del tubo digestivo sin dañarlo. Por otra parte, la lisozima, es una enzima con efectos antimicrobianos, mientras que otras enzimas cumplen funciones metabólicas más específicas. Tal es el caso de  $\alpha$ -amilasa, enzima que hidroliza parcialmente el almidón en la boca, comenzando así la digestión de los hidratos de carbono. Los iones cloruro, activan la amilasa salival (Humphrey y Williamson, 2001; Engelen *et al.*, 2003; Schipper *et al.*, 2007).

Una de las funciones importantes de la saliva, escasamente estudiada, consiste en proporcionar una capacidad tamponante o de estabilización del pH bucal (Lenander-Lumikari *et al.*, 2000). El pH de la saliva fluctúa entre 6,2 y 7,4, con valores mayores a medida que aumenta la velocidad de la secreción salival (Schipper *et al.*, 2007). La capacidad tamponante de la saliva se refiere a su capacidad para contrarrestar los cambios de pH en la boca producidos por los alimentos, dependiendo principalmente de la presencia de bicarbonato (Humphrey y Williamson, 2001), de péptidos de bajo peso molecular ricos en histidina (Mandel, 1989; citado por Humphrey y Williamson, 2001) y, en menor medida, de iones fosfato. Esta propiedad de la saliva ayuda a proteger a los tejidos bucales de la acción de los ácidos (o álcalis) provenientes de la comida y bebida o de la placa bacteriana. Al igual que otros tampones, la saliva funciona convirtiendo una solución ácida o alcalina, altamente ionizada, en una solución más débilmente ionizada (que libera sólo una fracción de los  $H^+$  u  $OH^-$ ). Un tampón poderoso (alta capacidad tamponante) es aquel que permite mantener estable el pH tras su mezcla con una alta concentración de protones o radicales hidroxilo libres. Por estos antecedentes, resulta de interés si durante el proceso de degustación, la mezcla de la saliva, con un pH neutro y tamponado, con una bebida compleja, ácida y con una capacidad tamponante propia, como es el vino, podría producir una alteración del pH de la saliva o del vino. En este último caso, la sensorialidad asociada al pH del vino debiera ser interpretada en relación al pH de la mezcla saliva-vino. En la literatura especializada es escasa la información sobre la magnitud del efecto tamponante que presenta la saliva frente a un vino o el vino frente a la saliva.

## Objetivo

Evaluar el efecto de la saliva humana sobre el pH de vinos comerciales tanto en condiciones de degustación como en simulaciones realizadas *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar del estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Supramolecular del Programa de Biología Celular y Molecular-ICBM de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y en los Laboratorios de Química Enológica y Cromatografía del Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

### Materiales

#### Saliva humana y vinos

Las muestras de saliva se obtuvieron de tres individuos sanos, sin estimulación de la salivación y bajo condiciones similares a las propuestas por Obreque-Slier *et al.*, (2010).

Se utilizaron dos vinos comerciales Misiones de Rengo variedad Cabernet Sauvignon 2009 Serie L-0039 y Sauvignon Blanc 2010 Serie L-0288.

#### Equipamiento y reactivos

Los equipos utilizados en este estudio fueron un potenciómetro marca Jenway 3510 dotado de un electrodo de vidrio combinado, un espectrofotómetro marca Unicam Helios Gamma, una centrifuga 75008151 Labofuge marca Heraeus 400, un filtro Advantec 300 mL, un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un detector de fotodiodos alineados (HPLC-DAD) marca Agilent Technologies 1200, dotado de una bomba Quat G1311A, un inyector automático modelo ALS G1329A, un detector de arreglo de fotodiodos DAD modelo G1316A, un degasificador modelo G1322A, una columna Discovery RP Amide C16 (5  $\mu\text{m}$ , 4,6 mm di x 25 mm) y un Agitador Gallenkamp Magnetic Stirrer.

Se utilizaron los siguientes reactivos: azul de bromotimol, hidróxido de sodio, glucosa, licor de Fehling Causse-Bonnans, carbón vegetal, ácido clorhídrico concentrado, etanol, bisulfito sódico, soluciones estándar de pH 4 (cloruro de potasio 3M) y pH 7 (fosfato monobásico de potasio, tetraborato de sodio) y reactivos de grados pro-análisis y HPLC. Los estándares de ácidos orgánicos (tartárico, málico, cítrico) se adquirieron en Merck (Darmstadt, Germany) y el estándar de ácido láctico se adquirió en Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EEUU).

## Métodos

### Procedimiento

**Obtención de saliva total.** Dos mujeres sanas de 23 y 25 años, y un hombre sano de 28 años, participaron en carácter de voluntarios en el estudio. Los donantes mantuvieron una alimentación balanceada y similar durante el estudio. Los donantes no presentaron evidencia de enfermedad en los 60 días previos al estudio. Para la colección de saliva se usó un procedimiento convencional, sin el uso de estimulantes (saliva pasiva), el cual fue llevado a cabo bajo condiciones estándar, entre las 9 y 11 a.m., inmediatamente antes de cada ensayo (Atkinson *et al.*, 1993). En cada colección, la saliva fue acumulada en la boca durante 1 minuto y expectorada en un envase de vidrio previamente esterilizado. Las muestras fueron mantenidas en hielo durante el periodo de ensayo (Obreque-Slier *et al.*, 2010).

**Medición del pH.** Antes de la medición de las muestras, el potenciómetro (pHmetro) fue calibrado mediante el empleo de soluciones estándar de pH 4 y pH 7. Inmerso el electrodo en la solución a medir sometida a agitación mecánica, se esperó habitualmente 15 segundos para permitir el equilibrio electroquímico en el sensor (electrodo) de pH.

**Efecto de la saliva sobre el pH de los vinos.** Se midió el pH en condiciones *in vitro* e *in vivo* tras la mezcla de saliva humana de cada uno de los tres donantes con vinos de las variedades Cabernet Sauvignon y Sauvignon Blanc.

a.- Ensayo *in vitro*. Alícuotas de 3 mL de muestra de saliva humana fueron depositados en un vaso precipitado. Se midió el pH (pH inicial). También se midió el pH que se haría interactuar con la saliva (pH del vino). A la saliva se agregó una alícuota de vino con agitación mecánica de la mezcla durante 15 segundos y se volvió a medir el pH. El procedimiento se repitió sucesivamente hasta completar la adición de un volumen total de vino de 18 mL. El volumen de las alícuotas de vino adicionadas a la mezcla fue aumentado gradualmente. Así, las alícuotas de vino agregadas fueron de a) 5  $\mu$ L hasta alcanzar un volumen total de vino en la mezcla de 200  $\mu$ L; b) 20  $\mu$ L desde los 200  $\mu$ L hasta alcanzar 300  $\mu$ L de vino total; c) 50  $\mu$ L desde los 300  $\mu$ L hasta un volumen de 600  $\mu$ L de vino; d) 100  $\mu$ L desde los 600  $\mu$ L hasta los 3 mL de vino; e) 1 mL desde los 3 mL hasta los 9 mL de vino acumulado y, finalmente, f) 3 mL desde los 9 mL hasta alcanzar el volumen final de 18 mL de vino acumulado en la mezcla (Figura 1).

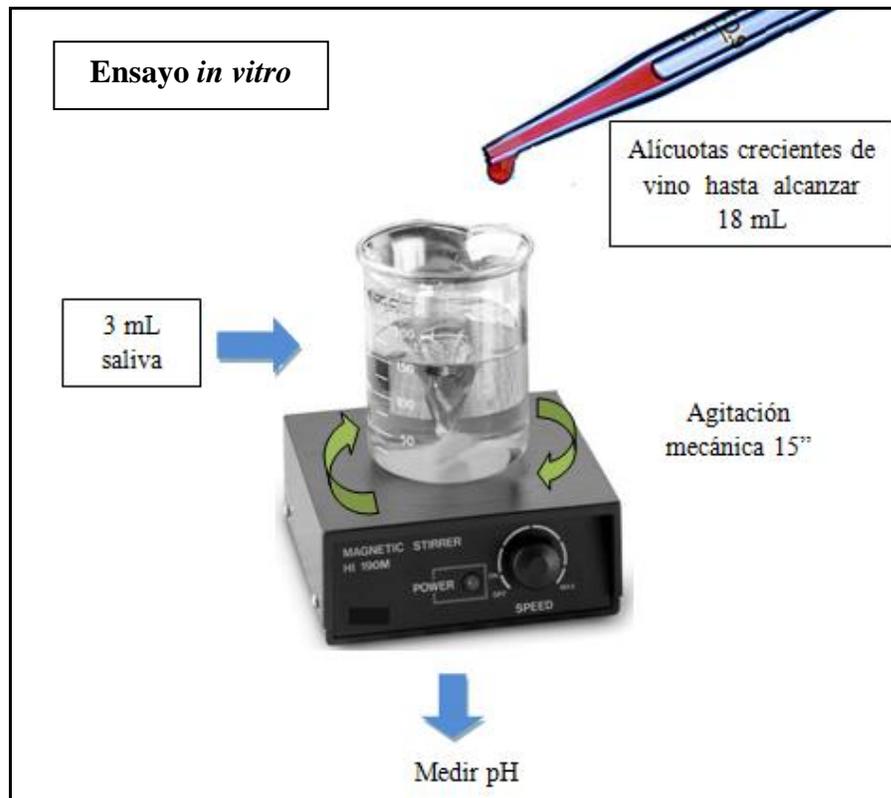


Figura 1. Diagrama de ensayo *in vitro* para evaluar el efecto de la saliva sobre el pH del vino.

b.- Ensayo *in vivo*. En la boca de cada donante de saliva se depositó una alícuota de vino en el rango 1,5-18 mL (1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 6,0; 9,0; 15,0 y 18,0 mL). El donante mezcló durante 15 segundos el vino con su saliva y devolvió la mezcla saliva-vino a un vaso precipitado. En la mezcla recolectada se midió el pH. Entre ensayos sucesivos transcurrieron 5 minutos, en los cuales el donante realizó un enjuague bucal con agua (Figura 2).

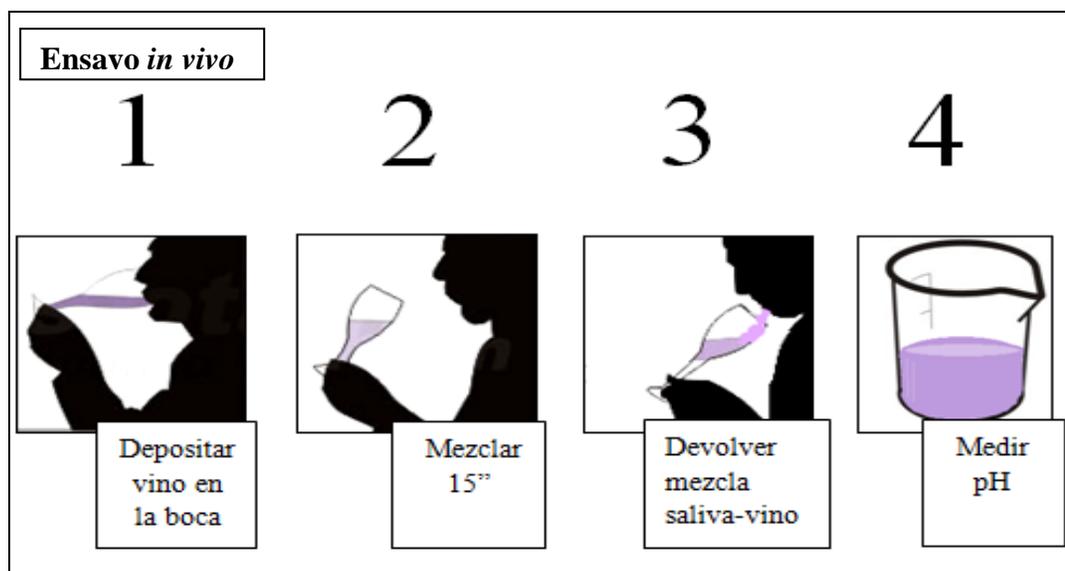


Figura 2. Diagrama de ensayo *in vivo* para evaluar el efecto de la saliva sobre el pH del vino.

**Caracterización química de los vinos del estudio.** A cada uno de los vinos se les determinó: a) fenoles totales por espectrofotometría DO 280 nm (García-Barceló, 1990), b) taninos totales mediante la reacción de metil celulosa (Mercurio *et al.*, 2007), c) antocianos totales por el método de decoloración por bisulfito (García-Barceló, 1990), d) intensidad colorante (420 nm + 520 nm + 620 nm para vinos tintos y 420 nm para vinos blancos) (Glories, 1978), e) acidez total mediante el método de determinación alcalimétrica con NaOH 0,1 N utilizando como indicador fenolftaleína para el vino blanco y el indicador Azul de bromotimol (BBT) para el vino tinto, f) pH mediante potenciometría (Bordeau y Scarpa, 1998), g) contenido de alcohol etílico mediante el método densimétrico (Bordeau y Scarpa, 1998), h) azúcares reductores mediante el método del Licor de Fehling Causse-Bonnans (Bordeau y Scarpa, 1998) e i) análisis de ácidos orgánicos (ácidos tartárico, málico, cítrico y láctico) mediante HPLC-DAD (Hong *et al.*, 2006; Kafkas *et al.*, 2006).

### Diseño experimental

El diseño experimental que se utilizó en este estudio fue totalmente al azar con 2 ensayos, correspondientes al ensayo *in vitro* (ensayo 1) e *in vivo* (ensayo 2) para cada vino (Cabernet Sauvignon y Sauvignon Blanc). El ensayo *in vitro* consideró 86 tratamientos, correspondientes a los diferentes volúmenes de vino adicionado a la mezcla saliva-vino y a los controles de saliva y vino, cada uno con tres repeticiones. Por su parte, el ensayo *in vivo* constó de 10 tratamientos, correspondientes a los diferentes volúmenes de vino depositados en la boca de cada donante y a los controles de saliva y vino, con tres repeticiones cada uno. La participación de cada donante en cada uno de los tratamientos fue en triplicado. La unidad experimental fue la mezcla saliva-vino (Cuadro 1).

Cuadro 1. Ensayos y tratamientos para evaluar el efecto de la saliva humana sobre el pH del vino.

Ensayo	Variedad de vino	N° de tratamientos	Repeticiones
Ensayo 1	Cabernet Sauvignon	86	3
	Sauvignon Blanc	86	3
Ensayo 2	Cabernet Sauvignon	10	3
	Sauvignon Blanc	10	3

### Análisis estadístico

Los resultados del ensayo *in vitro* fueron analizados por la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis utilizando el programa estadístico InfoStat. En el caso de existir diferencias significativas entre los tratamientos se realizó una prueba de comparación múltiple utilizando la diferencia entre medias. Los resultados del ensayo *in vivo* se analizaron mediante ANDEVA utilizando el programa estadístico Minitab 16. En el caso de existir diferencias significativas entre los tratamientos se realizó el test de Tukey con un error del 5%.

## RESULTADOS

### Caracterización química de los vinos del estudio

El Cuadro 2 muestra la caracterización química realizada a los vinos utilizados en este estudio. En relación a los parámetros polifenólicos, fue posible observar que los valores de intensidad colorante, fenoles, taninos y antocianos totales en los vinos tintos fueron mayores que los observados en el vino blanco. De la misma manera, el vino tinto presentó valores mayores de pH, grado alcohólico y azúcares reductores comparado con el vino blanco, mientras que la acidez de titulación fue mayor en este último. El análisis de ácidos mediante HPLC-DAD demostró la presencia de ácido tartárico y láctico en ambos vinos, mientras que en vino blanco se detectó además la presencia de ácido málico y cítrico. Es interesante señalar que el vino tinto presentó una concentración de ácido láctico muy superior a la del vino blanco mientras que este último presentó mayores concentraciones del resto de los ácidos identificados.

Cuadro 2. Valores promedios de la caracterización química del vino tinto y blanco.

<b>Parámetro</b>	<b>Vino tinto</b>	<b>Vino blanco</b>
Fenoles totales (g EAG/L)	1,7 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Taninos totales (g/L de procianidina)	1,4 ± 0,3	0,1 ± 0,0
Antocianos totales (mg/L de malvidina)	309,4 ± 19,4	-
Intensidad colorante	9,4 ± 0,1	0,1 ± 0,0
Acidez titulable (g/L de ácido tartárico)	4,8 ± 0,2	6,6 ± 0,1
pH	3,8 ± 0,0	3,4 ± 0,0
Alcohol etílico (g/L de etanol)	13,8 ± 0,0	12,2 ± 0,3
Azúcares reductores (g/L de glucosa)	4,3 ± 0,4	2,8 ± 0,1
Ácido tartárico (mg/L)	3.514,9 ± 20,2	3.986,7 ± 102,8
Ácido málico (mg/L)	0,0 ± 0,0	3.641,9 ± 115,3
Ácido cítrico (mg/L)	0,0 ± 0,0	1.089,1 ± 92,4
Ácido láctico (mg/L)	12.714,7 ± 78,6	1.409,2 ± 94,9

### pH tras la interacción de vino con saliva humana

#### Ensayo *in vitro*

El Cuadro 3 muestra la variación del pH de la mezcla saliva-vino a medida que aumenta la cantidad de vino (blanco o tinto) que se hace interactuar *in vitro* con un volumen fijo de saliva (3000  $\mu$ L). Los valores iniciales de pH, es decir, antes de la mezcla fueron 7,25 y 7,19 en el caso de la saliva, y 3,84 y 3,38 en el caso de los vinos tinto y blanco, respectivamente.

Los resultados muestran que a medida que aumenta el volumen de vino blanco o de vino tinto, el pH de la mezcla disminuyó gradualmente. Sin embargo, esta disminución fue distinta tanto para los vinos tinto y blanco como para los diferentes tramos de la adición de los mismos. Cuando se adicionó vino blanco, los valores de pH de la mezcla saliva-vino blanco fueron menores en todos los tratamientos con respecto al ensayo con vino tinto (Figura 3).

Cuadro 3. Valores de pH de la mezcla de saliva-vino tinto y blanco obtenidos a partir del ensayo *in vitro*.

Tratamiento	$\mu$ L de vino	pH saliva-vino tinto			pH saliva-vino blanco		
1	0	7,25	$\pm$	0,2	7,19	$\pm$	0,1
2	5	7,29	$\pm$	0,2	7,18	$\pm$	0,2
3	10	7,28	$\pm$	0,2	7,06	$\pm$	0,2
4	15	7,27	$\pm$	0,2	7,02	$\pm$	0,3
5	20	7,24	$\pm$	0,2	7,14	$\pm$	0,1
6	25	7,23	$\pm$	0,2	7,12	$\pm$	0,1
7	30	7,21	$\pm$	0,2	7,11	$\pm$	0,1
8	35	7,23	$\pm$	0,2	7,05	$\pm$	0,2
9	40	7,21	$\pm$	0,2	7,06	$\pm$	0,1
10	45	7,21	$\pm$	0,2	7,05	$\pm$	0,1
11	50	7,20	$\pm$	0,2	7,00	$\pm$	0,1
12	55	7,19	$\pm$	0,2	6,97	$\pm$	0,1
13	60	7,16	$\pm$	0,2	6,92	$\pm$	0,1
14	65	7,17	$\pm$	0,2	6,90	$\pm$	0,1
15	70	7,16	$\pm$	0,3	6,88	$\pm$	0,1
16	75	7,14	$\pm$	0,3	6,85	$\pm$	0,1
17	80	7,14	$\pm$	0,3	6,84	$\pm$	0,1
18	85	7,12	$\pm$	0,3	6,80	$\pm$	0,1
19	90	7,11	$\pm$	0,3	6,73	$\pm$	0,2
20	95	7,09	$\pm$	0,3	6,72	$\pm$	0,2
21	100	7,07	$\pm$	0,3	6,69	$\pm$	0,2
22	105	7,04	$\pm$	0,3	6,63	$\pm$	0,2
23	110	7,03	$\pm$	0,3	6,56	$\pm$	0,2

(continúa)

Cuadro 3 (continuación). Valores de pH de la mezcla de saliva-vino tinto y blanco obtenidos a partir del ensayo *in vitro*.

Tratamiento	$\mu\text{L}$ de vino	pH saliva-vino tinto		pH saliva-vino blanco	
24	115	7,01	$\pm 0,3$	6,53	$\pm 0,2$
25	120	7,01	$\pm 0,3$	6,48	$\pm 0,2$
26	125	6,98	$\pm 0,3$	6,42	$\pm 0,2$
27	130	6,97	$\pm 0,3$	6,39	$\pm 0,3$
28	135	6,95	$\pm 0,3$	6,33	$\pm 0,3$
29	140	6,92	$\pm 0,3$	6,28	$\pm 0,3$
30	145	6,90	$\pm 0,3$	6,23	$\pm 0,3$
31	150	6,87	$\pm 0,3$	6,16	$\pm 0,3$
32	155	6,84	$\pm 0,3$	6,11	$\pm 0,4$
33	160	6,82	$\pm 0,3$	6,05	$\pm 0,4$
34	165	6,78	$\pm 0,3$	6,00	$\pm 0,4$
35	170	6,76	$\pm 0,3$	5,95	$\pm 0,4$
36	175	6,73	$\pm 0,3$	5,88	$\pm 0,4$
37	180	6,70	$\pm 0,3$	5,85	$\pm 0,4$
38	185	6,68	$\pm 0,3$	5,83	$\pm 0,4$
39	190	6,66	$\pm 0,3$	5,77	$\pm 0,4$
40	195	6,64	$\pm 0,4$	5,73	$\pm 0,4$
41	200	6,58	$\pm 0,4$	5,68	$\pm 0,4$
42	220	6,51	$\pm 0,3$	5,57	$\pm 0,3$
43	240	6,39	$\pm 0,4$	5,44	$\pm 0,3$
44	260	6,29	$\pm 0,4$	5,33	$\pm 0,3$
45	280	6,16	$\pm 0,4$	5,23	$\pm 0,3$
46	300	6,05	$\pm 0,3$	5,11	$\pm 0,3$
47	350	5,84	$\pm 0,3$	4,95	$\pm 0,2$
48	400	5,63	$\pm 0,3$	4,82	$\pm 0,2$
49	450	5,46	$\pm 0,3$	4,70	$\pm 0,2$
50	500	5,29	$\pm 0,2$	4,60	$\pm 0,2$
51	550	5,17	$\pm 0,2$	4,51	$\pm 0,2$
52	600	5,06	$\pm 0,1$	4,43	$\pm 0,2$
53	700	4,89	$\pm 0,1$	4,33	$\pm 0,2$
54	800	4,74	$\pm 0,0$	4,25	$\pm 0,1$
55	900	4,62	$\pm 0,1$	4,15	$\pm 0,1$
56	1000	4,54	$\pm 0,0$	4,09	$\pm 0,1$
57	1100	4,47	$\pm 0,0$	4,03	$\pm 0,1$
58	1200	4,41	$\pm 0,0$	3,97	$\pm 0,1$
59	1300	4,36	$\pm 0,0$	3,94	$\pm 0,1$
60	1400	4,32	$\pm 0,0$	3,89	$\pm 0,1$
61	1500	4,29	$\pm 0,0$	3,85	$\pm 0,1$
62	1600	4,25	$\pm 0,0$	3,82	$\pm 0,1$
63	1700	4,23	$\pm 0,0$	3,78	$\pm 0,1$

(continúa)

Cuadro 3 (continuación). Valores de pH de la mezcla de saliva-vino tinto y blanco obtenidos a partir del ensayo *in vitro*.

Tratamiento	$\mu\text{L}$ de vino	pH saliva-vino tinto			pH saliva-vino blanco		
64	1800	4,21	$\pm$	0,0	3,77	$\pm$	0,1
65	1900	4,18	$\pm$	0,0	3,74	$\pm$	0,1
66	2000	4,17	$\pm$	0,0	3,72	$\pm$	0,1
67	2100	4,14	$\pm$	0,0	3,70	$\pm$	0,1
68	2200	4,12	$\pm$	0,0	3,69	$\pm$	0,1
69	2300	4,10	$\pm$	0,0	3,68	$\pm$	0,1
70	2400	4,09	$\pm$	0,0	3,66	$\pm$	0,1
71	2500	4,08	$\pm$	0,0	3,64	$\pm$	0,1
72	2600	4,06	$\pm$	0,0	3,64	$\pm$	0,1
73	2700	4,05	$\pm$	0,0	3,62	$\pm$	0,1
74	2800	4,04	$\pm$	0,0	3,62	$\pm$	0,1
75	2900	4,04	$\pm$	0,0	3,60	$\pm$	0,1
76	3000	4,03	$\pm$	0,0	3,58	$\pm$	0,1
77	4000	3,99	$\pm$	0,0	3,55	$\pm$	0,0
78	5000	3,94	$\pm$	0,0	3,50	$\pm$	0,0
79	6000	3,91	$\pm$	0,0	3,48	$\pm$	0,0
80	7000	3,90	$\pm$	0,0	3,45	$\pm$	0,0
81	8000	3,88	$\pm$	0,0	3,44	$\pm$	0,0
82	9000	3,87	$\pm$	0,0	3,42	$\pm$	0,0
83	12000	3,86	$\pm$	0,0	3,41	$\pm$	0,0
84	15000	3,85	$\pm$	0,0	3,40	$\pm$	0,0
85	18000	3,84	$\pm$	0,0	3,39	$\pm$	0,0
86	Vino sin saliva	3,84	$\pm$	0,0	3,38	$\pm$	0,0

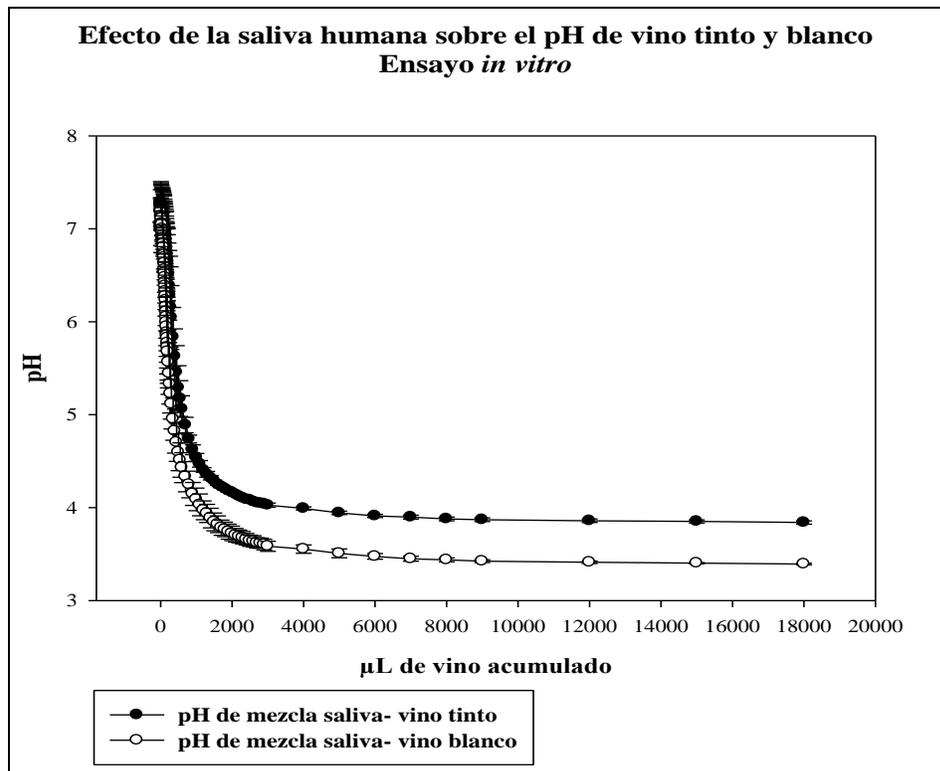


Figura 3. Progresión del pH de la mezcla *in vitro* entre saliva humana total (3 mL) y adiciones continuas de vino tinto o vino blanco.

En la Figura 3, nótese la semejanza de las curvas correspondientes a ambos vinos y la marcada caída del pH de la mezcla saliva-vino provocada por la adición continua de volúmenes de vino entre 5  $\mu$ L y menos de 4 mL. Volúmenes mayores al señalado produjeron una lenta pero continua progresión del pH de la mezcla saliva-vino hasta alcanzar valores de pH indistinguibles del correspondiente al vino solo.

Al analizar estadísticamente los resultados del pH de las mezclas entre saliva y vino tinto o entre saliva y vino blanco (Cuadro 1, Apéndice I y Cuadro 3, Apéndice II), se observó que existen diferencias significativas entre los tratamientos ( $p$ -value < 0,05) y que al adicionar de forma independiente volúmenes de vino tinto y blanco desde 350  $\mu$ L hasta 18000  $\mu$ L (Tratamientos 47-85), la mezcla presentó valores de pH similares al del vino utilizado (Tratamiento 86 en ambos vinos) (Cuadro 2, Apéndice I y Cuadro 4, Apéndice II).

Un análisis detallado de la progresión del pH en la primera parte de la adición de vino tinto o blanco (1800  $\mu$ L o menos) a una alícuota de 3 mL de saliva se muestra en la Figura 4. En el caso del vino tinto, se observó que la adición de los primeros 100  $\mu$ L provocó un descenso de menos de 0,2 unidades de pH (desde 7,25 a 7,07), mientras que con la adición de los siguientes 100  $\mu$ L (para completar 200  $\mu$ L de vino adicionado) el descenso en el pH fue alrededor del doble del observado en el primer tramo (desde 7,07 a 6,58). Con los siguientes 100  $\mu$ L de vino (para completar 300  $\mu$ L de vino adicionado) la tasa de descenso

del pH fue máxima (desde 6,58 a 6,05). Finalmente, a partir de los 300  $\mu\text{L}$  de vino tinto adicionado la tasa de descenso del pH de la mezcla saliva-vino producida por cada nueva alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de vino comenzó a disminuir continuamente. Así, entre 300 y 400  $\mu\text{L}$  de vino adicionado el descenso del pH fue sólo desde 6,05 a 5,63, entre 400 y 500  $\mu\text{L}$  descendió desde 5,63 a 5,29 y desde 500 a 600  $\mu\text{L}$  el descenso fue desde 5,29 a 5,06. La disminución en la tasa de descenso del pH de la mezcla saliva-vino tinto fue continua hasta alcanzar un valor 0 cuando la mezcla alcanzó el pH del vino tinto.

Por otra parte, cuando se analizó la tasa de descenso del pH de la mezcla saliva-vino cuando se adicionó vino blanco, se pudo apreciar que la tendencia fue semejante a la observada en el ensayo con vino tinto, con la diferencia que el descenso del pH en el primer tramo fue aún más pronunciado. Tomadas ambas curvas en conjunto, es posible identificar en la primera parte de la curva de adición de vino (primeros 100  $\mu\text{L}$ ) una resistencia al descenso de pH en la mezcla saliva-vino y que en los siguientes 100  $\mu\text{L}$  tal resistencia alcanza un mínimo. Por otra parte, por la naturaleza de sus ácidos, el vino blanco ensayado (rico en ácido tartárico y ácido málico) superó más fácilmente (mayor pendiente de la curva correspondiente en la Figura 4) la capacidad tamponante de la saliva que el vino tinto.

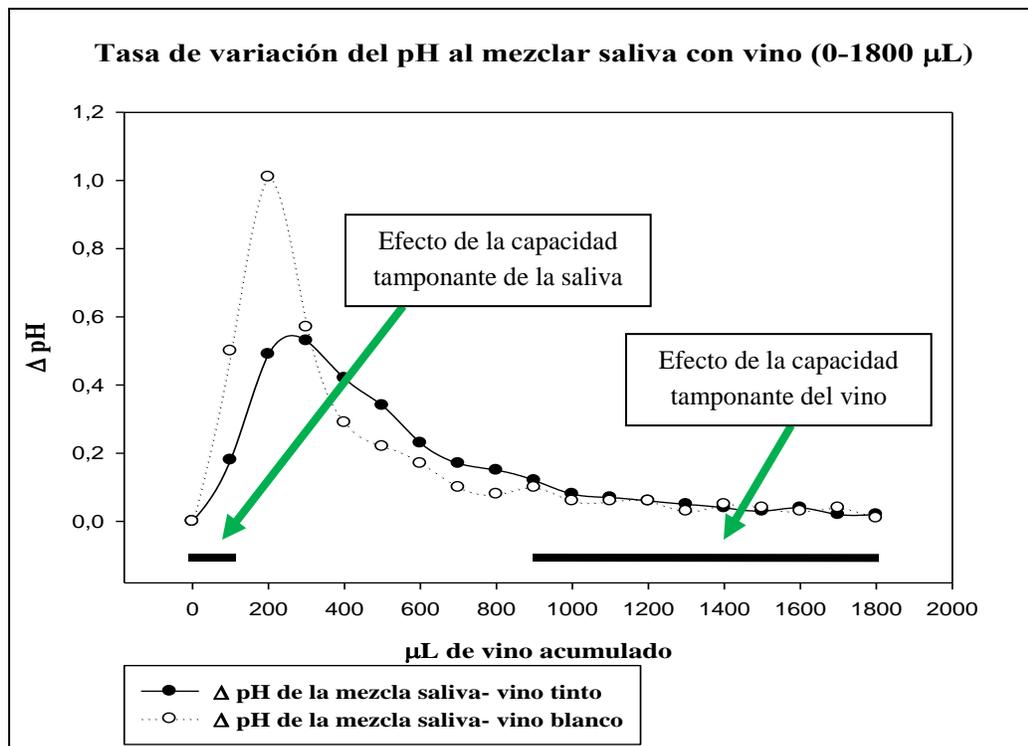


Figura 4. Tasa de variación del pH de la mezcla *in vitro* entre saliva humana total (3 mL) y adiciones continuas de volúmenes menores de vino tinto o vino blanco.

### Efecto de salivas de distintos individuos sobre el pH del vino

Atendiendo a la necesidad de normalizar las condiciones experimentales, en los ensayos antes descritos se empleó el promedio de los resultados obtenidos tanto del pH de la saliva de los tres donantes como el de los valores de pH de las mezclas saliva-vino para cada una de las adiciones de volúmenes crecientes de vino. Las Figuras 5 y 6 muestran las curvas de progresión del pH en mezclas entre volúmenes crecientes de vino tinto (Figura 5) o vino blanco (Figura 6) con muestras de saliva (3 mL) de cada uno de los donantes. Con la adición continua de vino tinto a cada una de las tres salivas diferentes empleadas en este estudio se observaron descensos en el pH de las mezclas saliva-vino que fueron indistinguibles entre sí y que presentaron las mismas características descritas antes con respecto al empleo de vino tinto. Las mismas observaciones fueron hechas cuando el estudio se realizó con vino blanco.

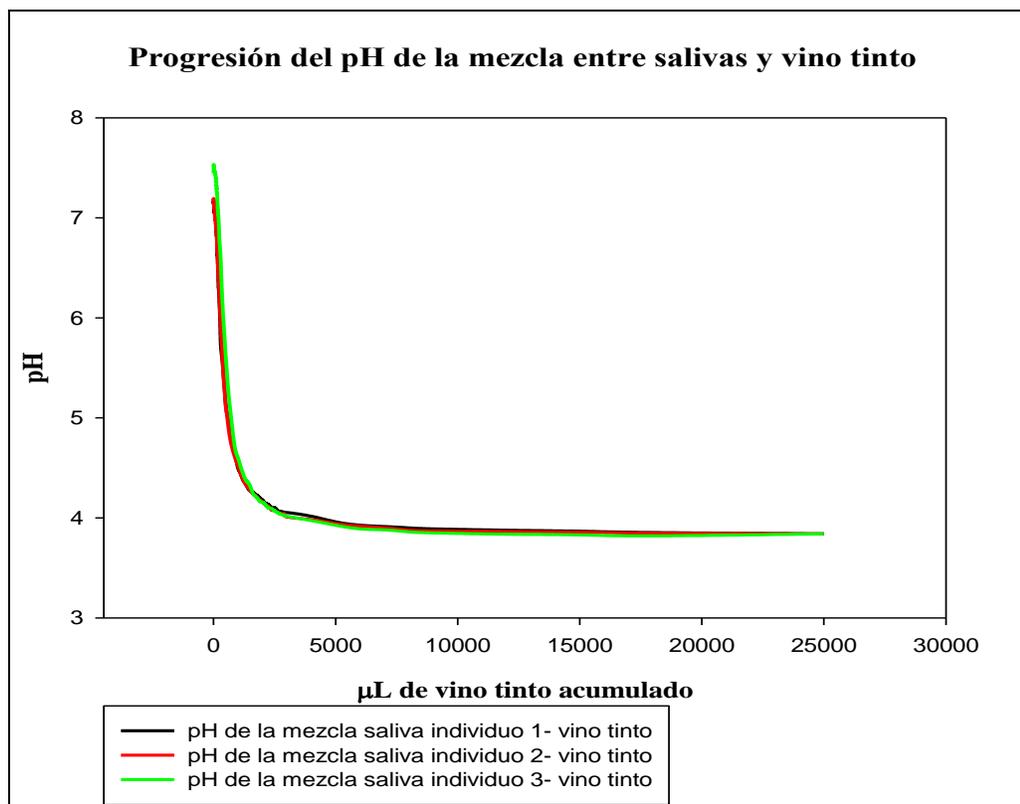


Figura 5. Progresión del pH de la mezcla *in vitro* entre salivas (3 mL) de tres individuos diferentes con la adición continua de vino tinto.

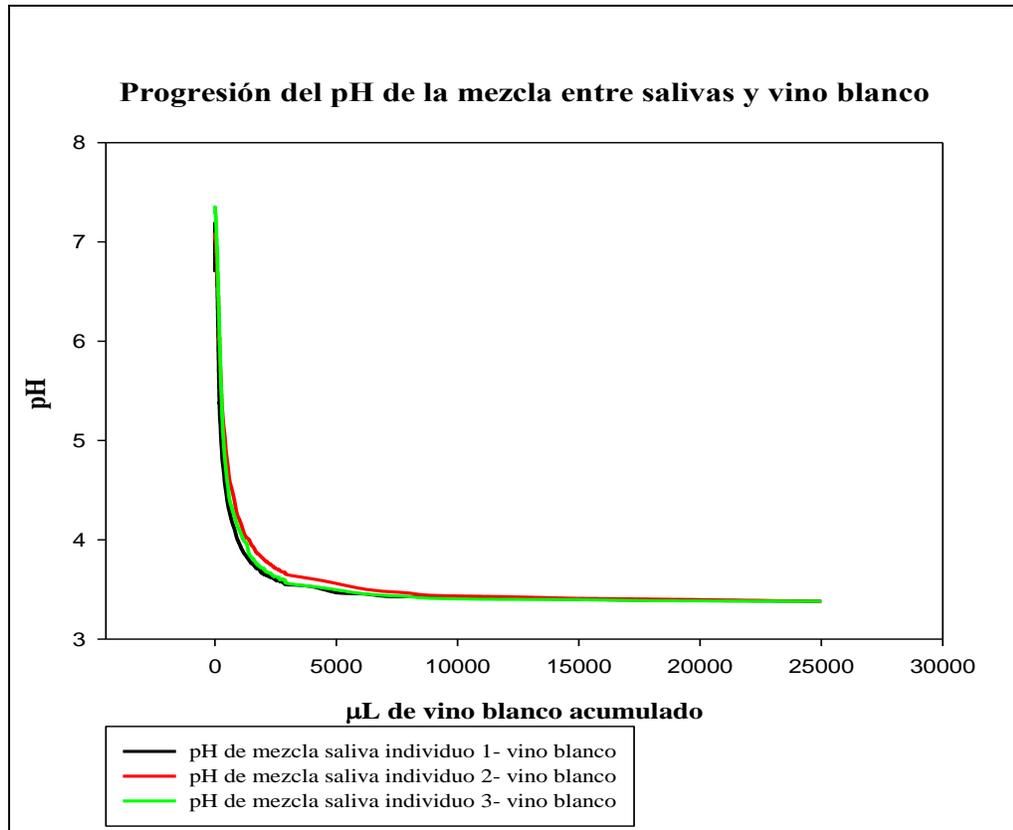


Figura 6. Progresión del pH de la mezcla *in vitro* entre salivas (3 mL) de tres individuos diferentes con la adición continua de vino blanco.

### Ensayo *in vivo*

En este ensayo los evaluadores colocaron en su boca cantidades crecientes de uno de los vinos, para luego de mezclarlo con la saliva bucal devolverlo en un vaso precipitado para la medición del pH.

El valor de pH de la saliva en ausencia de vino correspondió a 7,2 (Cuadro 4). En el estudio se observó que una cantidad de 1,5 mL de vino depositada en la boca fue suficiente para producir una disminución abrupta y estadísticamente significativa del pH de la mezcla saliva-vino. Con el empleo de volúmenes superiores a esta cantidad de vino, los valores de pH de la mezcla disminuyeron hasta 3,9 (pH del vino tinto) y 3,4 (pH del vino blanco). Nuevamente se observó que en el ensayo con vino blanco los valores de pH observados en todos los tratamientos fueron menores que el observado con tratamientos equivalentes con vino tinto (Figura 7). Los Cuadros 5 y 6 (Apéndice III), muestran que los tratamientos presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí ( $p$ -value < 0,05). Asimismo, este ensayo permitió observar que el depósito en boca de volúmenes de 3 ó 6 mL de vinos tinto o blanco, respectivamente, fueron suficientes para que la mezcla saliva-vino alcanzara el pH del vino.

Cuadro 4. Valores de pH de la mezcla de saliva-vino tinto y saliva-vino blanco en el ensayo *in vivo*

Tratamiento	mL de vino	pH mezcla saliva-vino tinto	pH mezcla saliva-vino blanco
1	0	7,25 ± 0,2 e	7,19 ± 0,1 e
2	1,5	4,25 ± 0,1 d	3,90 ± 0,1 d
3	2	4,17 ± 0,1 cd	3,78 ± 0,1 d
4	2,5	4,14 ± 0,1 bcd	3,74 ± 0,1 cd
5	3	4,08 ± 0,0 abcd	3,70 ± 0,0 bcd
6	6	3,96 ± 0,1 abc	3,52 ± 0,0 abc
7	9	3,92 ± 0,0 ab	3,47 ± 0,0 ab
8	15	3,90 ± 0,0 ab	3,42 ± 0,0 a
9	18	3,90 ± 0,0 a	3,41 ± 0,0 a
10	Vino sin saliva	3,90 ± 0,0a	3,40 ± 0,0 a

Letras minúsculas distintas sobre columnas, indican diferencias significativas entre los tratamientos a un nivel de significancia del 5% (según test de Tukey).

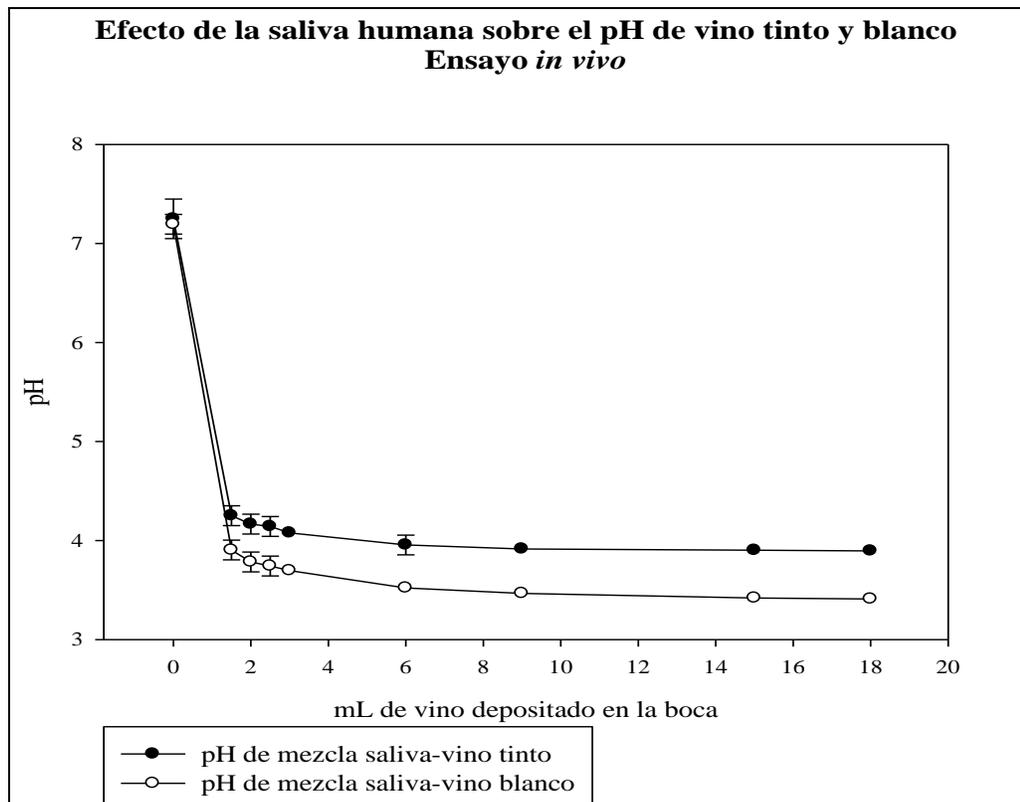


Figura 7. Representación gráfica de la progresión del pH de la mezcla *in vivo* entre saliva y vinos tinto o blanco.

## DISCUSIÓN

El vino está constituido principalmente por agua, alcoholes, azúcares, compuestos fenólicos, azufrados, nitrogenados y aromáticos, elementos minerales, ésteres y ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos presentes en el vino proceden por un lado de las uvas, esencialmente de la pulpa de las bayas (ácidos tartárico, málico y cítrico), o pueden originarse durante los procesos de fermentación alcohólica, maloláctica, oxidación del etanol, entre otros (ácidos succínico, láctico y acético) (Kritsunankul *et al.*, 2009). El contenido de estos ácidos es importante en el vino desde el punto de vista del sabor y por sus efectos sobre el color, la estabilidad microbiológica, la vida media del producto y el pH (Zoecklein *et al.*, 2001).

Por otro lado, la saliva es un fluido secretado por diversas glándulas (Schipper *et al.*, 2007). Una función de la saliva que es de alta relevancia y escasamente estudiada, consiste en proporcionar una capacidad tamponante o de estabilización del pH bucal (Lenander-Lumikari *et al.*, 2000). Esto se refiere a la capacidad que posee la saliva para contrarrestar los cambios de pH en la boca producidos por los alimentos, mediante la unión de iones hidrógeno (protones) o hidroxilo libres.

En este estudio se evaluó el efecto de la saliva humana sobre el pH de dos vinos comerciales, uno tinto y uno blanco, los cuales fueron caracterizados químicamente. En relación a los parámetros polifenólicos, fue posible observar que los valores de intensidad colorante, fenoles, taninos y antocianos totales concuerdan con lo observado en otros estudios, tanto en vino blanco (Flanzy, 2000, Zoecklein *et al.*, 2001; Hernanz *et al.*, 2007) como en vino tinto (Hashizume *et al.*, 1998; Arnous *et al.*, 2001; Ketter, 2008; Ginjom *et al.*, 2010). De la misma manera, los mayores valores de los análisis fenólicos observados en el vino tinto son consistentes con lo informado por diversos autores (Flanzy, 2000; Landrault *et al.*, 2001; Zamora, 2003). Estas diferencias se deberían a características fenólicas propias de cada uva (Mazza *et al.*, 1999; Mattivi *et al.*, 2006; Recamales *et al.*, 2006), así como a manejos enológicos diferenciales realizados en ambas uvas para la obtención de un vino blanco o tinto (Kovac *et al.*, 1992; Gómez-Plaza *et al.*, 2000; Fuhrman *et al.*, 2001; Maggu *et al.*, 2007).

En el caso del grado alcohólico y azúcares reductores, el vino tinto mostró valores mayores que el vino blanco, coincidente también con lo observado en estudios anteriores (Cándida *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2007; Willershausen *et al.*, 2009). En cuanto al mayor grado alcohólico del vino tinto, la diferencia se debería al mayor contenido de azúcares fermentables de la uva destinada a la producción de vino tinto (Hidalgo, 2003). Por su parte, el mayor contenido de azúcares reductores en el vino tinto estaría dado principalmente por azúcares no fermentados debido a manejos enológicos que no permitieron la metabolización completa por parte de la levadura (Hidalgo, 2003). Por otra parte, se pudo observar que mientras el valor de acidez titulable fue mayor en el vino

blanco, los valores de pH fueron mayores en el vino tinto. Esto podría deberse a particularidades propias de las uvas vinificadas (Flanzy, 2000), o a manejos enológicos durante la elaboración del vino destinados a modificar la acidez (adición de ácido tartárico, málico o cítrico, fermentación maloláctica, etc.). La adición de ácidos en la producción de vinos (Walker *et al.*, 2002; Kritsunankul *et al.*, 2009) provocaría un aumento de la acidez titulable y una disminución del pH (Walker *et al.*, 2002; Hidalgo, 2003).

Los resultados de los diferentes ácidos analizados mediante HPLC-DAD demostraron la presencia de ácido tartárico y láctico en ambos vinos, mientras que en vino blanco se detectó además la presencia de ácido málico y cítrico. Las concentraciones de los diferentes ácidos identificados en los vinos coinciden con lo observado en otros estudios (Walker *et al.*, 2003; Kotani *et al.*, 2004; Peres *et al.*, 2009). Es interesante señalar que el vino tinto presentó una mayor concentración de ácido láctico, lo que se debería a la realización de la fermentación maloláctica, donde ocurre la síntesis de este ácido (Campos *et al.*, 2009; Kritsunankul *et al.*, 2009), mientras que el vino blanco presentó mayores concentraciones del resto de los ácidos identificados.

Para evaluar el efecto de la saliva humana sobre el pH de los vinos caracterizados anteriormente, se realizaron dos ensayos: uno *in vitro* y otro *in vivo*. Este último se realizó con el propósito de simular condiciones que son usuales durante una degustación. En el ensayo *in vitro*, fue posible notar que la adición paulatina de vino a la muestra salival provocó una disminución gradual del pH de la mezcla saliva-vino. En este ensayo se emplearon alícuotas de 3 mL de saliva, volumen cuya manipulación para la medición del pH en un potenciómetro convencional resultaba cómoda. La adición de una solución más ácida, como el vino, a la alícuota de saliva produjo una disminución del pH asociada al volumen de vino agregado. La disminución del pH de la mezcla saliva-vino al inicio del ensayo ocurrió tras la incorporación de volúmenes pequeños de vino (5  $\mu$ L), acción realizada con el objetivo de apreciar con precisión la expresión de una propiedad de la saliva humana, su capacidad tamponante.

Los resultados del ensayo *in vitro* permitieron detectar que la adición de pequeños volúmenes de vino tinto a 3 mL de saliva provocaron un descenso en el pH de la mezcla saliva-vino que resultó escasamente detectable en los primeros 100  $\mu$ L de vino. En este tramo del ensayo la disminución observada presentó una pendiente de menos de 0,2 unidades de pH/100  $\mu$ L de vino, incrementándose significativamente hasta casi triplicarse en los tres tramos siguientes de 100  $\mu$ L. Esta observación sugiere que el sistema tamponante de la saliva era más manifiesto frente a la necesidad de neutralizar los primeros volúmenes de vino (primeros 100  $\mu$ L), capacidad que fue rápidamente superada con las adiciones de vino siguientes (desde 100 a 300  $\mu$ L de vino tinto). Con la incorporación de 280  $\mu$ L de vino tinto, se produjo una disminución del pH de la mezcla con saliva (3000  $\mu$ L) desde 7,25 a 6,16. Se ha descrito que en una solución, la capacidad tamponante se pierde cuando se produce una variación de pH en una unidad (Silva y Chiffelle, 2005). Esta observación muestra claramente que bajo las condiciones de este estudio, cantidades bajas de vino tinto sobrepasan la capacidad tampón de la saliva. El principal sistema tamponante

de la saliva está representado por el ácido carbónico/ión bicarbonato cuyo pKa es 6,1. Por su parte, el vino tinto utilizado en este estudio exhibió un alto contenido de ácido láctico cuyo pKa es 3,86 (Flanzy, 2000). Cabe destacar que el pKa, parámetro que corresponde al pH en el cual el ácido del sistema tamponante está disociado en un 50%, es la zona en la cual el sistema exhibe su más alta capacidad tamponante. Considerando lo anterior, la adición de volúmenes de vino tinto por sobre lo necesario para superar la capacidad tamponante de la saliva y el alto contenido de ácido láctico presente en éste explican el hecho que la mezcla saliva-vino tinto exhibiera un pH de 3,8. Adicionalmente, superada la capacidad tamponante de la saliva se comienza a hacer evidente el sistema tamponante propio del vino.

Los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro* con vino tinto sugieren que al momento de realizar una evaluación sensorial, debido a que los degustadores colocan en su boca volúmenes de vino del orden de 10-15 mL (Jackson, 2009), la capacidad tamponante de la saliva es superada por el vino tinto y que éste mantiene su pH independientemente de la presencia de saliva.

Por otra parte, el vino blanco presentó como principales ácidos constituyentes a los ácidos tartárico (pKa 3,01) y málico (pKa 3,46) (Flanzy, 2000). Tales constantes señalan que, siendo débiles, ambos ácidos son más fuertes que el ácido láctico (pKa 3,86). Por tal motivo, la adición de vino blanco a la saliva sobrepasó tempranamente la capacidad tamponante de esta última (la variación de una unidad de pH se observó con la adición de 150  $\mu$ L, desde pH 7,19 a 6,16) y frente a un “exceso” de vino blanco, el pH de la mezcla saliva-vino alcanzó un pH de 3,38, correspondiente al pH del vino blanco. Este valor es intermedio entre los pKs de ambos ácidos abundantes en el vino blanco empleado. Por lo tanto, al igual que en el caso del vino tinto, bajos volúmenes de vino blanco fueron suficientes para superar el efecto tamponante de la saliva. Asimismo, considerando los resultados del ensayo *in vitro* con vino blanco es posible aseverar firmemente que los volúmenes de vino blanco usados habitualmente en una degustación permiten que durante ésta el pH del vino se mantenga inalterado.

Teniendo en consideración que los ensayos realizados son aproximaciones experimentales “*in vitro*”, es decir, en las que en un recipiente se busca reproducir condiciones reales (en este caso la interacción del vino con la saliva en la boca), también se realizaron ensayos “*in vivo*”. Estos consistieron en colocar volúmenes medidos de vino en boca y, tras la mezcla correspondiente con la saliva bucal, se midió el pH de la mezcla saliva-vino devuelta a un recipiente. En estos ensayos se observó que a medida que se depositaron en la boca volúmenes crecientes de vino tinto y blanco, el pH de la mezcla saliva-vino disminuyó desde 7,2 (pH inicial) a 3,9 (pH del vino tinto) y a 3,4 (pH del vino blanco). Es interesante señalar que la colocación de un volumen de sólo 1,5 mL de vino en la boca es suficiente para disminuir significativamente el pH de la mezcla saliva-vino desde 7,2 a 4,3 (vino tinto) y desde 7,2 a 3,9 (vino blanco).

De acuerdo a diversos autores, la saliva es secretada a una tasa basal de alrededor de 0,5 mL/minuto, pudiendo alcanzar en condiciones de estimulación un flujo de 7 mL/minuto (Schipper *et al.*, 2007). En la boca se mantiene normalmente una cantidad de saliva que varía entre 230 y 1310  $\mu$ L con un promedio cercano a 700  $\mu$ L (Müller *et al.*, 2010). Considerando estos antecedentes, los resultados del ensayo *in vivo* permiten estimar que una proporción de saliva:vino de 1:2,14 es suficiente para superar significativamente el efecto tamponante de la saliva. Esta observación en boca es consistente con lo observado en el ensayo *in vitro* en el que se mezcló vino con saliva pura.

Finalmente, la colocación en la boca de 3 mL de vino tinto o 6 mL de vino blanco hizo que el pH de la mezcla saliva-vino igualara el pH del vino. Considerando el volumen de vino que utilizan los degustadores en una evaluación sensorial (10-15 mL), la saliva no tiene un efecto significativo sobre el pH del vino y en consecuencia, todos los atributos sensoriales asociables a su pH, justifican la atención que el enólogo pueda prestar a este parámetro de calidad durante la preparación y degustación de los vinos.

## CONCLUSIONES

En condiciones *in vitro*, tanto el vino blanco como el vino tinto producen una disminución del pH de la mezcla saliva-vino. Esta disminución del pH refleja la superación de la capacidad tamponante de 3 mL de saliva que se observa con la adición de volúmenes bajos de ambos vinos (280  $\mu$ L de vino tinto y 150  $\mu$ L de vino blanco). Superada la capacidad tamponante de la saliva, adiciones desde 350  $\mu$ L de vino permiten que el pH de la mezcla saliva-vino sea similar al pH del vino correspondiente.

En condiciones *in vivo* (en boca), el vino blanco y el vino tinto producen una disminución significativa del pH de la mezcla saliva-vino, superando la capacidad tamponante de la saliva con una proporción saliva:vino de 1:2,14. Asimismo, la incorporación de 3 mL de vino tinto ó 6 mL de vino blanco en la boca, redujeron el pH de la mezcla saliva-vino hasta el pH del vino correspondiente.

Volúmenes de vino correspondientes a los empleados normalmente durante una degustación, 10-15 mL, depositados y mezclados con la saliva bucal generan la pérdida total de la capacidad tamponante de la saliva y el vino mantiene en boca su pH original.

**BIBLIOGRAFÍA**

Arnous, A., D. Makris and P. Kefalas. 2001. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5736-5742.

Atkinson, J.C., C. Dawes, T. Ericson, P.C. Fox, B.K. Gandara, D. Malamud, I.D. Mandel, M. Navazesh and L.A. Tabak. 1993. Guidelines for saliva nomenclature and collection. *Annals of the New York Academy Sciences* 694: 11-12.

Bordeau, E. y J. Scarpa. 1998. *Análisis Químico del Vino*. Universidad Católica de Chile. 253 p.

Campos, F., A. Figueiredo, T. Hogg and J. Couto. 2009. Effect of phenolic acids on glucose and organic acid metabolism by lactic acid bacteria from wine. *Food Microbiology* 26: 409-414.

Cándida, L., F. Pardo, A. Zalacain, G. Alonso and M. Salinas. 2005. Effect of red grapes co-winemaking in polyphenols and color of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 7609-7616.

De Smet, K. and R. Contreras. 2005. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnology Letters* 25:1337-1347.

Engelen, L., R.A.Wijk, J.F. Prinz, A. Van der Bilt and F. Bosman. 2003. The relation between saliva flow rate after different stimulations and the perception of flavor and texture attributes in custard desserts. *Physiology and Behavior* 78: 165-169.

Fernández, K., J. Kennedy and E. Agosin. 2007. Characterization of *Vitis vinifera* L. Cv. Carménere grape and wine proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 3675-3680.

Flanzy, C. 2000. *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 783 p.

Furhman, B., N. Volkova, A. Suraski and M. Aviram. 2001. White wine with red wine-like properties: increased extraction of grape skin polyphenols improves the antioxidant capacity of the derived white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 3164-3168.

García-Barceló, J. 1990. *Técnicas analíticas para vinos*. Ediciones FAB. Barcelona, España. 1713 p.

Ginjom, I., B. D'Arcy, N. Caffin and M. Gidley. 2010. Phenolic contents and antioxidant activities of major australian red wines throughout the winemaking process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 10133-10142.

Glories, Y. 1978. Recherches sur la matière colorantes des vins rouges. Thèse doctorat d'état, Université de Bordeaux II, France. 364 p.

Gómez-Plaza, E., R. Gil-Muñoz, J. López Roca and A. Martínez. 2000. Color and phenolic compounds of a young red wine. Influence of wine-making techniques storage temperature, and length of storage time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 736-741.

Hashizume, K., S. Kida and T. Samuta. 1998. Effect of steam treatment of grape cluster stems on the methoxypyrazine, phenolic, acid, and mineral content of red wines fermented with stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4382-4386.

Hernanz, D., A. Recamales, M. González-Miret, M. Gómez-Míguez, I. Vicario and F. Heredia. 2007. Phenolic composition of White wines with a prefermentative maceration at experimental and industrial scale. *Journal of Food Engineering* 80: 327-335.

Hidalgo, J. 2003. Tratado de enología. Ediciones Mundi- Prensa. Madrid, España. 1423 p.

Hong, Y., Z. Wei, J. Xin-qian, Y. Bing-jun and Z. Dao-wei. 2006. Analysis of organic acids accumulated in *Kochia scoparia* shoots and roots by reserve-phase high performance liquid chromatography under salt and alkali stress. *Chemical Research in Chinese Universities* 22(3): 315-318.

Humphrey, SP. and R. Williamson. 2001. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *Journal Prosthetic Dentistry* 85: 162-9.

Jackson, R. 2009. Wine tasting: A Professional handbook. Elsevier/Academic press: Amsterdam. 495 p.

Kafkas, E., M. Kosar, N. Turemis and K.H.C. Baser. 2006. Analysis of sugars, organic acids and vitamin C contents of blackberry genotypes from Turkey. *Food Chemistry* 97: 732-736.

Ketter, R. 2008. Caracterización de la composición fenólica de vinos comerciales del cv. Cabernet sauvignon provenientes de tres valles de Chile, de las vendimias 2002 y 2003. Memoria Ingeniero Agrónomo Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Santiago, Chile. 56 p.

Kotani, A., Y. Miyaguchi, E. Tomita, K. Takamura and F. Kusu. 2004. Determination of organic acids by hig-performance liquid chromatography with electrochemical detection during wine brewing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1440-1444.

Kovac, V., E. Alonso, M. Bourzeix and E. Revilla. 1992. Effect of several enological practices on the content of catechins and proanthocyanidins of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 1953-1957.

Kritsunankul, O., B. Pramote and J. Jakmune. 2009. Flow injection on-line dialysis coupled to high performance liquid chromatography for the determination of some organic acids in wine. *Talanta* 79: 1042-1049.

Landrault, N., P. Poucheret, P. Ravel, F. Gasc, G. Cros and P. Teissedre. 2001. Antioxidant capacities and phenolics levels of french wines from different varieties and vintages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 3341-3348.

Lenander-Lumikari, M. and V. Loimaranta. 2000. Saliva and dental caries. *Advances in Dental Research* 14: 40-47.

Maggu, M., R. Winz, P. Kilmartin, M. Trought and L Nicolau. 2007. Effect of skin contact and pressure on the composition of Sauvignon Blanc must. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 10281-10288.

Mattivi, F., R. Guzzon, U. Vrhovsek, M. Stefanini and R Velasco. 2006. Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 7692-7702.

Mato, I., S. Suárez-Luque and J. Huidobro. 2005. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Research International* 38: 1175-1188.

Mazza, G., L. Fukumoto, P. Delaquis, B. Girard and B. Ewert. 1999. Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4009-4017.

Mercurio, M., R. Damberg, M. Herderich and P. Smith. 2007. High throughput analysis of red wine and grape phenolics- Adaptation and validation of methyl cellulose precipitable tannin assay and modified somers color assay to a rapid 96 well plate format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4651-4657.

Müller, K., C. Figueroa, C. Martínez, M. Medel, E. Obreque-Slier, A. Peña-Neira, I. Morales-Bozo, H. Toledo and R. López-Solis. 2010. Measurement of saliva volume in the mouth of members of a trained sensory panel using a beetroot (*Beta vulgaris*) extract. *Food Quality and Preference* 21: 569-574.

Obreque-Slier, E. A. Peña-Neira and R. López-Solis. 2010. Enhancement of both salivary protein-enological tannin interactions and astringency perception by ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 3729-3735.

Peres, R., E. Moraes, G. Micke, F. Tonin, M. Tavares and D. Rodriguez-Amaya. 2009. Rapid method for the determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Food Control* 20: 548–552.

Recamales, A., A. Sayago, M. González-Miret and D. Hernanz. 2006. The effect of time storage and conditions on the phenolic composition and colour of white wine. *Food Research International* 39: 220-229.

Silva, C. y I. Chiffelle. 2005. *Química General Universitaria*. Santiago, Chile. 358 p.

Schipper, R., E. Silletti and M. Vingerhoeds. 2007. Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. *Journal Science Direct* 52: 1114-1135.

Van Nieuw Amerongen, A., J.G.M. Bolscher and E.C.I. Veerman. 2004. Salivary proteins: prospective and diagnostic value in cariology? *Caries Research* 38: 247-53.

Walker, T., J. Morris, R. Threlfall and G. Main. 2002. pH Modification of Cynthiana wine using cationic exchange. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6346-6352.

Walker, T., J. Morris, R. Threlfall and G. Main. 2003. Analysis of Wine Components in Cynthiana and Syrah wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 1543-1547.

Willershausen, B., A. Callawaya, B. Azraka, C. Kloß and B. Schulz-Dobrick. 2009. Prolonged in vitro exposure to white wines enhances the erosive damage on human permanent teeth compared with red wines. *Nutrition Research* 29: 558–567.

Zamora, F. 2003. *Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos*. Ediciones Mundi-prensa. Madrid, España. 225 p.

Zoecklein, B., K. Fugelsang, B. Gump y F. Nury. 2001. *Análisis y producción de vino*. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 613 p.

## APÉNDICE

## Apéndice I

Cuadro 1. Prueba de Kruskal- Wallis. Ensayo *in vitro* vino tinto.

Tratamiento	N	Medias	H	p
1	3	7,25	239,39	< 0,0001
2	3	7,29		
3	3	7,28		
4	3	7,27		
5	3	7,24		
6	3	7,23		
7	3	7,21		
8	3	7,23		
9	3	7,21		
10	3	7,21		
11	3	7,20		
12	3	7,19		
13	3	7,17		
14	3	7,17		
15	3	7,16		
16	3	7,14		
17	3	7,14		
18	3	7,12		
19	3	7,11		
20	3	7,09		
21	3	7,07		
22	3	7,04		
23	3	7,03		
24	3	7,01		
25	3	7,00		
26	3	6,98		
27	3	6,97		
28	3	6,95		
29	3	6,92		
30	3	6,90		
31	3	6,87		
32	3	6,84		
33	3	6,82		
34	3	6,78		
35	3	6,76		
36	3	6,73		
37	3	6,69		
38	3	6,68		

(continúa)

Cuadro 1 (continuación). Prueba de Kruskal- Wallis. Ensayo *in vitro* vino tinto.

<b>Tratamiento</b>	<b>N</b>	<b>Medias</b>	<b>H</b>	<b>p</b>
39	3	6,66		
40	3	6,64		
41	3	6,58		
42	3	6,50		
43	3	6,39		
44	3	6,29		
45	3	6,16		
46	3	6,04		
47	3	5,84		
48	3	5,63		
49	3	5,46		
50	3	5,29		
51	3	5,17		
52	3	5,06		
53	3	4,89		
54	3	4,74		
55	3	4,62		
56	3	4,54		
57	3	4,47		
58	3	4,41		
59	3	4,36		
60	3	4,32		
61	3	4,29		
62	3	4,25		
63	3	4,23		
64	3	4,21		
65	3	4,18		
66	3	4,17		
67	3	4,14		
68	3	4,12		
69	3	4,11		
70	3	4,09		
71	3	4,08		
72	3	4,07		
73	3	4,05		
74	3	4,04		
75	3	4,04		
76	3	4,03		
77	3	3,99		
78	3	3,94		
79	3	3,91		
80	3	3,90		
81	3	3,88		
82	3	3,87		
83	3	3,86		

(continúa)

Cuadro 1 (continuación). Prueba de Kruskal- Wallis. Ensayo *in vitro* vino tinto.

Tratamiento	N	Medias	H	p
84	3	3,85		
85	3	3,84		
86	3	3,84		

Cuadro 2. Prueba de comparación múltiple entre diferencias de medias. Ensayo *in vitro* vino tinto.

Tratamiento	Ranks	
2	235,67	-
4	233,17	^ -
3	232,50	] ^ -
1	229,33	\ ] ^ -
5	226,83	[ \ ] ^ -
6	225,33	[ \ ] ^ -
8	224,67	[ \ ] ^ -
10	221,17	z [ \ ] ^ -
9	220,83	z [ \ ] ^ -
7	220,00	z [ \ ] ^ -
11	218,00	z [ \ ] ^ -
12	214,17	y z [ \ ] ^ -
14	211,83	y z [ \ ] ^ -
13	210,17	x y z [ \ ] ^ -
15	209,50	x y z [ \ ] ^ -
17	204,83	w x y z [ \ ] ^ -
16	204,50	w x y z [ \ ] ^ -
18	202,17	v w x y z [ \ ] ^ -
19	201,67	v w x y z [ \ ] ^ -
20	199,00	u v w x y z [ \ ] ^ -
21	196,83	t u v w x y z [ \ ] ^ -
22	194,17	t u v w x y z [ \ ] ^ -
23	193,17	s t u v w x y z [ \ ] ^ -
24	191,50	s t u v w x y z [ \ ] ^ -
25	189,83	r s t u v w x y z [ \ ] ^ -
26	187,83	r s t u v w x y z [ \ ] ^ -
27	186,17	q r s t u v w x y z [ \ ] ^ -
28	184,83	q r s t u v w x y z [ \ ] ^ -
29	182,33	P q r s t u v w x y z [ \ ] ^ -
30	180,50	o P q r s t u v w x y z [ \ ] ^ -
31	178,17	o P q r s t u v w x y z [ \ ] ^ -

(continúa)

Cuadro 2 (continuación). Prueba de comparación múltiple entre diferencias de medias.  
 Ensayo *in vitro* vino tinto.

Tratamiento	Ranks
32	175,83 n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _
33	174,50 m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _
34	169,50 l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _
35	167,17 k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _
36	163,00 j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _
37	160,00 j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _
38	157,83 i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _
39	155,33 h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _
40	153,00 h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _
41	150,67 g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _
42	145,17 f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _
43	138,17 e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _
44	134,83 d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _
45	130,83 c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _
46	126,67 b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _
47	119,67 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _
48	116,17 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^
49	113,17 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ]
50	110,33 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ]
51	107,50 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [
52	104,83 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z
53	101,83 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z
54	98,17 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y
55	94,83 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y
56	91,83 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x
57	89,17 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w
58	85,83 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w
59	82,83 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v
60	80,00 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u
61	77,67 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t
62	73,83 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s
63	70,83 a b c d e f g h i j k l m n o p q r
64	68,00 a b c d e f g h i j k l m n o p q
65	64,50 a b c d e f g h i j k l m n o p
66	62,83 a b c d e f g h i j k l m n o
67	58,67 a b c d e f g h i j k l m n
68	55,83 a b c d e f g h i j k l m

(continúa)

Cuadro 2 (continuación). Prueba de comparación múltiple entre diferencias de medias.  
Ensayo *in vitro* vino tinto.

Tratamiento	Ranks
69	52,83 a b c d e f g h i j k l
70	49,33 a b c d e f g h i j k
71	47,50 a b c d e f g h i j
72	44,17 a b c d e f g h i j
73	39,17 a b c d e f g h i
74	37,33 a b c d e f g h
75	36,17 a b c d e f g h
76	33,50 a b c d e f g
77	29,50 a b c d e f
78	25,83 a b c d e f
79	22,00 a b c d e
80	19,50 a b c d e
81	15,67 a b c d
82	12,83 a b c
83	10,17 a b
84	9,00 a b
85	6,00 a
86	5,00 a

Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p \leq 0,05$ ).

## Apéndice II

Cuadro 3. Prueba de Kruskal-Wallis. Ensayo *in vitro* vino blanco.

Tratamiento	N	Medias	H	p
1	3	7,19	252,55	<0,0001
2	3	7,18		
3	3	7,06		
4	3	7,02		
5	3	7,14		
6	3	7,12		
7	3	7,11		
8	3	7,05		
9	3	7,06		
10	3	7,05		
11	3	7,00		
12	3	6,97		
13	3	6,92		
14	3	6,90		
15	3	6,88		
16	3	6,85		
17	3	6,84		
18	3	6,80		
19	3	6,73		
20	3	6,72		
21	3	6,69		
22	3	6,63		
23	3	6,56		
24	3	6,53		
25	3	6,48		
26	3	6,42		
27	3	6,39		
28	3	6,33		
29	3	6,28		
30	3	6,23		
31	3	6,16		
32	3	6,11		
33	3	6,05		
34	3	6,00		
35	3	5,95		
36	3	5,88		
37	3	5,85		
38	3	5,83		
39	3	5,77		
40	3	5,73		
41	3	5,68		
42	3	5,57		

(continúa)

Cuadro 3 (continuación). Prueba de Kruskal-Wallis. Ensayo *in vitro* vino blanco.

<b>Tratamiento</b>	<b>N</b>	<b>Medias</b>	<b>H</b>	<b>p</b>
43	3	5,44		
44	3	5,33		
45	3	5,23		
46	3	5,11		
47	3	4,95		
48	3	4,82		
49	3	4,70		
50	3	4,60		
51	3	4,51		
52	3	4,43		
53	3	4,33		
54	3	4,25		
55	3	4,15		
56	3	4,09		
57	3	4,03		
58	3	3,97		
59	3	3,94		
60	3	3,89		
61	3	3,85		
62	3	3,82		
63	3	3,78		
64	3	3,77		
65	3	3,74		
66	3	3,72		
67	3	3,70		
68	3	3,69		
69	3	3,68		
70	3	3,66		
71	3	3,64		
72	3	3,64		
73	3	3,62		
74	3	3,62		
75	3	3,60		
76	3	3,58		
77	3	3,55		
78	3	3,51		
79	3	3,48		
80	3	3,45		
81	3	3,44		
82	3	3,42		
83	3	3,41		
84	3	3,40		
85	3	3,39		
86	3	3,38		

Cuadro 4. Prueba de comparación múltiple entre diferencias de medias. Ensayo *in vitro* vino blanco.

Tratamiento	Ranks	
1	248,67	*
2	248,00	*
5	244,33	` *
6	242,67	_ ` *
7	241,50	_ ` *
9	235,17	^ _ ` *
3	234,67	^ _ ` *
10	234,50	^ _ ` *
8	234,33	^ _ ` *
4	231,83	] ^ _ ` *
11	230,33	] ^ _ ` *
12	226,50	\ ] ^ _ ` *
13	222,83	[ \ ] ^ _ ` *
14	219,83	z [ \ ] ^ _ ` *
15	217,67	z [ \ ] ^ _ ` *
16	213,83	y z [ \ ] ^ _ ` *
17	212,83	x y z [ \ ] ^ _ ` *
18	208,83	w x y z [ \ ] ^ _ ` *
19	203,50	v w x y z [ \ ] ^ _ ` *
20	202,17	u v w x y z [ \ ] ^ _ ` *
21	199,33	u v w x y z [ \ ] ^ _ ` *
22	193,33	t u v w x y z [ \ ] ^ _ ` *
23	188,83	s t u v w x y z [ \ ] ^ _ ` *
24	187,00	s t u v w x y z [ \ ] ^ _ ` *
25	183,17	r s t u v w x y z [ \ ] ^ _ ` *
26	180,50	q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _ ` *
27	177,50	p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _ ` *
28	173,33	o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _ ` *
29	170,50	n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _ ` *
30	167,33	m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _ ` *
31	164,67	l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _ ` *
32	162,33	l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _ ` *
33	160,00	k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _ ` *
34	157,00	j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _ ` *
35	154,67	i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _ ` *
36	151,33	i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _ ` *
37	150,33	h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _ ` *

(continúa)

Cuadro 4 (continuación). Prueba de comparación múltiple entre diferencias de medias.  
 Ensayo *in vitro* vino blanco.

Tratamiento	Ranks
38	149,17 h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _ ` *
39	146,33 h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _ ` *
40	143,50 g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _ ` *
41	142,00 g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _ ` *
42	138,33 f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _ ` *
43	135,00 e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _ ` *
44	131,33 d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _ ` *
45	128,50 c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _ `
46	123,67 b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^ _
47	119,33 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^
48	116,00 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ] ^
49	112,67 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ]
50	109,67 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ]
51	107,33 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ]
52	105,33 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z [ \ ]
53	101,33 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z
54	98,00 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y
55	94,17 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x
56	91,17 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w
57	88,33 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v
58	85,17 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v
59	82,83 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u
60	79,00 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t
61	74,83 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t
62	72,83 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s
63	69,50 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s
64	66,17 a b c d e f g h i j k l m n o p q r
65	63,50 a b c d e f g h i j k l m n o p q
66	60,50 a b c d e f g h i j k l m n o p
67	57,33 a b c d e f g h i j k l m n o
68	55,33 a b c d e f g h i j k l m n o
69	52,67 a b c d e f g h i j k l m n
70	50,00 a b c d e f g h i j k l m
71	46,83 a b c d e f g h i j k l
72	45,50 a b c d e f g h i j k l
73	42,67 a b c d e f g h i j k
74	42,17 a b c d e f g h i j k

(continúa)

Cuadro 4 (continuación). Prueba de comparación múltiple entre diferencias de medias.  
 Ensayo *in vitro* vino blanco.

Tratamiento	Ranks	
75	38,67	a b c d e f g h i j
76	36,17	a b c d e f g h i
77	31,50	a b c d e f g h
78	26,50	a b c d e f g
79	22,33	a b c d e f
80	19,83	a b c d e f
81	17,33	a b c d e
82	14,17	a b c d
83	11,17	a b c
84	8,17	a b
85	5,50	a b
86	2,50	a

Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p \leq 0,05$ ).

### Apéndice III

Cuadro 5. ANOVA unidireccional: pH vs. Tratamiento con vino tinto. Ensayo *in vivo*.

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b><i>p</i></b>
Tratamiento	9	28,6072	3,17858	459,68	0,000
Error	20	0,13830	0,00691		
Total	29	28,7455			

S = 0,08316    R-cuad. = 99,52%    R-cuad.(ajustado) = 99,30%

Cuadro 6. ANOVA unidireccional: pH vs. Tratamiento con vino blanco. Ensayo *in vivo*.

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b><i>p</i></b>
Volumen vino	9	35,8745	3,98607	748,57	0,000
Error	20	0,10650	0,00532		
Total	29	35,9810			

S = 0,07297    R-cuad. = 99,70%    R-cuad.(ajustado) = 99,57%