



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE CIENCIAS AMBIENTALES
Y BIOTECNOLOGÍA

“CALIDAD DEL VINO TINTO MEDIANTE ANÁLISIS DE LA INTENSIDAD DEL COLOR Y CONTENIDO DE ANTOCIANINAS”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de

Química Ambiental

CATALINA ANDREA REYES CORTÉS

Director de Seminario de Título: Dr. Álvaro Aliaga Cerón

Abril, 2020

Santiago de Chile



ESCUELA DE CIENCIAS AMBIENTALES Y BIOTECNOLOGÍA
– FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta. Catalina Andrea Reyes Cortés.

“CALIDAD DEL VINO TINTO MEDIANTE ANÁLISIS DE LA INTENSIDAD DEL COLOR Y CONTENIDO DE ANTOCIANINAS”

ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Químico Ambiental.

Director Seminario de Título:

Dr. Álvaro Aliaga Cerón _____

**Comisión Revisora y Evaluadora
Presidente Comisión:**

M. Cs. Sylvia Copaja _____

Evaluador:

Dr. José Cárcamo _____

Santiago de Chile, Abril 2020

BIOGRAFÍA



Catalina Andrea Reyes Cortés nació el 9 de junio de 1992 en Santiago de Chile, hija de María Cortés Cortés y Juan Reyes Pino, de profesión Técnico agrícola y operador de maquinarias respectivamente. Su hermano menor es Gonzalo Reyes Cortés y ha finalizado su carrera de Turismo y Hotelería.

Cursó la enseñanza básica en el colegio María Reina, luego la enseñanza media en el colegio San Carlos de Aragón, ambos ubicados en la comuna de Puente Alto. En el 2011 inició sus estudios de Química Ambiental en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

El 2018 finalizó sus estudios de pregrado y el 2019 comenzó su Seminario de Título con el profesor Álvaro Aliaga en el laboratorio de Espectroscopía vibracional en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Durante estos años también se desempeñó como ayudante en los laboratorios de Química General I y II.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente a mi familia, por su apoyo y amor incondicional, por su contención en momentos que sentí no podía más, por todos los tecitos que me revivían en las noches de estudio eterno, por esos abrazos de felicitaciones o por no haber logrado el resultado que esperaba, por enseñarme que la vida no es una nota, sino que lo valioso es aprender cada día algo nuevo.

A mis amigas y amigos, tanto de la U como de afuera, que, sin sus consejos, risas, carretes, retos, noches de estudio, y muchas otras cosas no hubiese llegado hasta acá.

A todo el laboratorio de Espectroscopía vibracional, que me enseñó a ser más constante con mi trabajo, a no frustrarme por los malos resultados y por la confianza entregada para realizar este seminario.

A Marisol de Escuela de pregrado, literalmente un sol, una luz entre todos nuestros problemas sin resolver.

A Diego, mi compañero de vida, mi descanso y tranquilidad, quien siempre me alentó a que si podía.

Finalmente, agradecer a CONICYT por financiar este seminario de título con los proyectos FONDECYT/11150944 y PAI/79150038.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Antecedentes generales.....	1
1.1.1.	Vino tinto, características y propiedades organolépticas.....	1
1.1.2	Consumo y producción.....	3
1.1.2.1.	Vinos orgánicos en Chile.....	4
1.2.	Antecedentes específicos.....	6
1.2.1.	Colorantes en la industria alimentaria y el vino.....	6
1.2.1.1	Antocianinas como colorante natural en el vino.....	7
1.2.1.2	Colorantes artificiales	8
1.2.2.	Técnicas de análisis de colorantes.....	9
1.2.2.1.	Algunas Figuras de mérito de un método analítico.....	11
1.2.3.	Implicancia en la salud de las personas y el medio ambiente.....	11
1.2.4.	Planteamiento del problema.....	12
1.3	Objetivo general.....	13
1.3.1.	Objetivos específicos.....	13
II.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
2.1.	Materiales.....	14
2.1.1	Reactivos.....	14
2.2	Análisis de parámetros químicos	14
2.2.1	pH y Conductividad eléctrica (CE).....	14
2.2.2	Contenido de Glucosa	14
2.3	Métodos analíticos	15

2.3.1	Preparación de muestras UV-vis y HPLC	15
2.3.2	Registros UV-vis y HPLC	16
III.	RESULTADOS.....	17
3.1.	Parámetros químicos.....	17
3.2.	Espectros UV/vis.....	20
3.3.	Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y análisis de figuras de mérito.....	29
IV.	DISCUSIÓN GENERAL.....	38
V.	CONCLUSIONES.....	41
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
VII.	ANEXOS.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Nombre y Sustituyentes de las antocianinas.....	2
Tabla 2: Datos registrados de pH, CE, y porcentaje de azúcar en las muestras.....	17
Tabla 3: Resultados cálculo de Intensidad del color.....	28
Tabla 4: Datos de regresión lineal de curva de calibración.....	32
Tabla 5: Resultados análisis de HPLC-DAD de antocianinas en muestras de vino tinto.....	33
Tabla 6: Datos de cromatografía de muestra T2.....	52
Tabla 7: Datos de cromatografía de muestra C2.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de las antocianidinas.....	2
Figura 2: Estructura planar básica de la malvidina-3-glucósido, se indica la numeración de las posiciones de la molécula.....	8
Figura 3. Estructuras químicas de colorantes artificiales: azorrubina (A) e Indigotina (B).....	9
Figura 4: Espectros de absorción UV/vis de muestras de vino tinto de bajo costo (T)...	20
Figura 5: Espectros de absorción UV/vis de muestras de vino tinto diluido con vino blanco (M).....	21
Figura 6: Espectros de absorción UV/vis de muestras de vino tinto diluido con vino blanco más adición de azorrubina (C).....	22
Figura 7: Espectro de absorción UV/vis de muestras de vino tinto a granel (G).....	23
Figura 8: Espectros de absorción UV-vis de soluciones de Azorrubina diluida en vino blanco a distintas concentraciones.....	24
Figura 9: Espectros de absorción UV-vis de soluciones de Azorrubina diluida en agua a distintas concentraciones.....	25
Figura 10: Espectro de Absorción UV-vis de solución estándar de malvidina-3-glucósido.	26
Figura 11: Perfil antocianos. Cromatograma de HPLC de vino (Kalecik karasi), registrados a 520 nm.....	29
Figura 12: Cromatograma de un perfil de antocianos de la muestra T2.....	30
Figura 13: Curva de calibración de malvidina-3-glucósido con ajuste lineal.....	31

Figura 14: Ajuste lineal de concentración de antocianinas (mgL^{-1}) versus absorbancia a 520 nm.....	35
Figura 15: Influencia estructural de la malvidina 3-O-(6-O- <i>p</i> -acetil)-glucósido en la evolución y estabilidad potencial del color del vino.....	49
Figura 16: Ajuste lineal de concentración de azorrubina disuelta en agua (mgL^{-1}) versus absorbancia a 520 nm.....	50
Figura 17: Ajuste lineal de concentración de azorrubina disuelta en vino blanco (mgL^{-1}) versus absorbancia a 520 nm.....	51
Figura 18: Cromatograma de perfil de antocianos de muestra C2.....	52

INDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1: Intensidad del color (I).....	10
Ecuación 2: Pendiente de una recta.....	36

Resumen

El color es una característica que se asocia históricamente a la calidad del vino. El tono y la intensidad del color son parámetros que dependen principalmente del contenido de antocianinas, las cuales son extraídas de la uva durante la maceración. Las antocianinas tienen una alta capacidad antioxidante y entregan beneficios a la salud de las personas.

En Chile hay un vino de alta calidad; sin embargo, no existen restricciones al uso de aditivos sintéticos en el proceso, considerando solamente las restricciones de mercados internacionales. En la Comunidad Europea está prohibido el uso de aditivos para dar color al vino (EU 1129/2011). A fines del 2017, el gobierno de Chile firma un acuerdo con la Comunidad Europea, para la exportación de productos orgánicos.

En el mundo científico se ha investigado los fraudes en el color en el vino, por la adición de colorantes, mediante las técnicas de cromatografía líquida de alta resolución, electroforesis capilar y espectrometría UV-Vis, detectando la azorrubina (colorante artificial); la ingesta reiterada de azorrubina puede generar complicaciones renales e incluso cáncer.

El objetivo de este seminario es analizar el color, como indicador de calidad del vino. La metodología se basa en las mediciones de la intensidad del color (UV-Vis), algunos parámetros químicos (acidez, conductividad eléctrica, porcentaje de azúcar) y la identificación de las antocianinas mediante cromatografía líquida de alta resolución con arreglo de diodos (HPLC-DAD). Se obtuvo como resultado final que la muestra T2 es la que presenta una mejor calidad respecto a las demás debido a que su valor de intensidad de color es el más alto (0,909) al igual que la cantidad de antocianinas encontradas en

su composición ($112,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Sin embargo, es preciso integrar las metodologías para poder evidenciar la presencia de un colorante artificial, ya que un aumento en la intensidad del color de un vino tinto debe ser proporcional a la cantidad de malvidina en su contenido.

Abstract

The color is historically associated with the quality of red wine. The hue and the intensity color are parameters that mainly depend on the anthocyanin content, which are extracted from the grape in maceration; anthocyanins have a high antioxidant capacity and provide benefits to people's health.

In Chile, we have a highquality wine; however, there are no restrictions on the use of synthetic additives in the process, considering only the restrictions of international markets. The use of additives on wine is prohibited in the European Community (EU 1129/2011). In 2017, the Chilean government signs an agreement with the European Community, for the export of organic products.

In the scientific sciences, color fraud has been investigated in wine, due to the composition of dyes, using high-performance liquid chromatography, capillary electrophoresis and UV-Visible spectrometry, detecting azorubine (artificial dye); repeated intake of azorubine can lead to kidney complications and even cancer.

The goal of this work is analyzing the color, as an indicator of wine quality. The methodology is based on measurements of color intensity (UV-Vis), some chemical parameters (acidity, electrical conductivity, sugar percentage) and the identification of anthocyanins by means of high-resolution liquid chromatography with diode array (HPLC-DAD). As a final result it was obtained that the T2 sample is the one that presents a better quality compared to the others because its color intensity value is the highest (0,909) as well as the quantity of anthocyanins found in its composition (112,1 mg*L⁻¹). However, it is necessary to integrate the methodologies to be able to demonstrate the presence of an artificial colorant, since an increase in the intensity of the color of a red wine must be proportional to the amount of malvidin in its content.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes generales.

1.1.1. Vino tinto, características y propiedades organolépticas.

Las características de un alimento, que pueden ser captadas por los sentidos de una persona, se le conocen como propiedades organolépticas (Bello, 2000). Las propiedades organolépticas asociadas al aroma y al color son características que permiten interpretar la calidad que adquiere el vino tinto durante todo el proceso de producción.

El color en el vino blanco y tinto es una característica utilizada por los enólogos, quienes evalúan la intensidad del color y la transparencia como parámetros de calidad. Todos los vinos tienen coloración amarilla, que proviene de flavonoides como taninos, flavanoles o proantocianidinas; los flavonoides son compuestos antioxidantes presentes en frutas y verduras, que se caracterizan por ser compuestos polifenólicos solubles en agua con grupos característicos (hidroxil, metoxil, metil, isoprenil o bencil). En el caso del vino tinto, el color corresponde a una mezcla de polifenoles que contienen principalmente taninos y antocianinas, otorgando una coloración rojiza (amarillo/rojo). El color rojo proviene principalmente del aporte de las antocianinas, que corresponden a las antocianidinas glucosiladas en la posición 3, destacando la pelargonidina, la cianidina, la delfinidina, la peonidina, la petunidina y la malvidina (figura 1). Así, las antocianinas determinan la intensidad del color rojo en el vino tinto, característica que ha sido utilizada como parámetro de calidad. (Casassa, F. 2007).

El vino blanco intensifica su color amarillo al envejecer, es decir, un vino varietal (joven) es poco intenso y transparente, en cambio uno reserva (añejo) tiene color amarillo intenso. En el vino tinto, el aporte de las antocianinas permite que un vino varietal tenga color rojo/violeta intenso, asociado al color que presenta a pH ácido, cuyo color cambia en el tiempo, tomando tonos rojo ladrillo producto de la transformación química de estos compuestos, por lo que un vino reserva va oscureciendo su color en el tiempo.

Tabla 1. Nombre y sustituyentes de las antocianinas.

	R1	R2	R3	$\lambda_{\text{máx}}$ nm
Pelargonidina	H	OH	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH ₃	OH	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH ₃	OH	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH ₃	OH	OCH ₃	510 (azul-rojo)

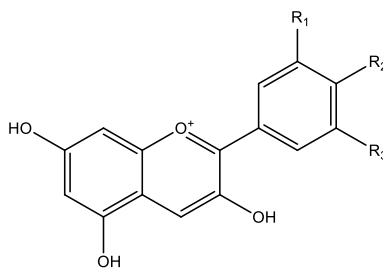


Figura 1. Estructura química de las antocianidinas.

(las antocianinas son antocianidinas con un grupo glucosídico en la posición 3).

1.1.2. Consumo y producción.

La producción de uva de calidad requiere de cuidados especiales, por ejemplo, la poda, manejo de follaje, eliminación de racimos, riego, fertilización y cosecha. Durante la maduración de la uva, y en forma opuesta a los azúcares que van aumentando continuamente, la presencia de ácidos en la fruta va descendiendo (ODEPA, 2015). Los parámetros más comunes en que los viticultores se basan para determinar la maduración de la uva son el contenido de azúcares y el contenido en ácidos (ODEPA, 2015). La fiesta de recolección o cosecha de las uvas que servirán para la producción de vino se le conoce como vendimia, actividad que se realiza una vez alcanzada la maduración de la uva.

Los procesos de producción del vino tinto comienzan luego de la vendimia. De estos procesos, se puede destacar la fermentación alcohólica y la maceración. En el primer proceso se transforma el azúcar en etanol mediante levaduras existentes en la uva. En el segundo proceso se extraen las antocianinas desde el hollejo de uvas oscuras, para dar el color rojo intenso, proceso que ocurre entre 1-4 semanas, por lo que el tiempo es fundamental para realizar una buena extracción.

En cuanto a los azúcares, en las uvas se deben alcanzar los valores adecuados al grado alcohólico probable del vino a producir, estimándose que por cada 17 gramos de azúcar se aumentará un grado de alcohol en un litro de vino. El alcohol cumple una función protectora de los ataques de diferentes bacterias o levaduras al vino. Por ejemplo, un vino tinto reserva tiene un alto contenido alcohólico, pues esto le ayuda a evolucionar más tiempo en buenas condiciones, mientras que en tintos jóvenes (varietales o de consumo en el año) tienen menor contenido alcohólico.

En general, los niveles de azúcares y de acidez en el vino tinto influirán directamente en la estabilidad química de las antocianinas, compuestos que también pueden ser afectados por distintos factores, tal como la temperatura, la fuerza iónica y la interacción con radicales libres o moléculas complejas (Garzón, 2008). En las antocianinas, los sustituyentes en las posiciones R₁, R₂ y R₃ (tabla 1 y figura 1) inducen cambios en el color, en una gama desde tonos rojos hasta azules. Los cambios de coloración dados por las antocianinas son relevantes en los vinos tintos envejecidos (G. González-Neves, 2003). El aumento en la acidez da lugar a un vino tinto con mayor intensidad de color rojo (Santamaría, 2005) intensidad que está dada por la estabilización de las antocianinas a pH ácido.

1.1.2.1. Vinos orgánicos en Chile.

La **agricultura orgánica** es un tipo de sistema productivo cuyo objetivo es mantener la salud de las personas y el medio ambiente, cuidando los recursos naturales durante el proceso de elaboración, envasado y distribución del producto. En general, la agricultura orgánica se basa en favorecer 4 principios de sustentabilidad:

- a) La salud del sistema (suelo, agua, flora, fauna y personas)
- b) Los ciclos ecológicos (producir en condiciones locales)
- c) La equidad (ambiente y personas),
- d) La precaución (conservar el ambiente).

Con estos principios, se deben combinar los conocimientos ancestrales con los avances científicos, al mismo tiempo que se promueven relaciones justas entre todos los involucrados (Comisión nacional de agricultura orgánica, 2007).

A fines de 2017, se firma el acuerdo entre Chile y la Unión Europea (UE) relativo a la equivalencia de normas para la certificación de productos orgánicos. Los vinos orgánicos (a veces llamados ecológicos) deben certificar la naturalidad de la uva (Reglamento (UE) No 848/2018), prohibiendo el uso de aditivos artificiales en los procesos. Actualmente, la industria chilena cumple distintos estándares de calidad, no existiendo diferencias tangibles entre el vino tradicional y el orgánico. La equivalencia de productos orgánicos (Ley 20.089, Chile) es el primer paso a la certificación del vino tinto que será una exigencia en la exportación al mercado internacional. En el mercado europeo la producción del vino orgánico ha tomado fuerza, al darle valor agregado al producto, donde se trabaja en forma manual los viñedos (sin intervención de máquinas), prohibiendo el uso de pesticidas, insecticidas o cualquier aditivo que genere un cambio en la química del vino. La naturalidad de los componentes requiere un proceso de certificación mediante auditorías externas.

La sociedad actual impone altas exigencias de calidad a la industria del vino tinto, donde las antocianinas cumplen un rol importante, sobre la base de su capacidad antioxidante, que otorga beneficios a la salud de las personas que lo consumen. Históricamente, la producción de vino en Chile ha sido considerada de alta calidad, con gran relevancia para el desarrollo económico del país. Chile cuenta con ventajas comparativas para la producción de vino de alta calidad, con gran diversidad de suelos y microclimas, en conjunto a barreras naturales que controlan las plagas (la cordillera de los andes, el desierto de atacama y el océano pacífico).

Las cepas de uva mayormente producidas en nuestro país corresponden a variedades tintas. Durante 2015, y según estadísticas del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), la mayor producción de cepas tintas con denominación de origen se concentró

en la variedad Cabernet Sauvignon (35,4%), Merlot (12,8%), Carmenere (8,9%), Syrah (6,9%), Pinot Noir (2,4%) y País o Misión (1,8%). La producción de vinos total del año 2017 fue alrededor de 949 millones de litros (SAG, 2017).

En el mundo se ha incrementado la demanda por productos naturales, incluyendo al vino de carácter orgánico (ecológico). Existen interesantes perspectivas para la producción de vino orgánico en Chile dada la toma de conciencia por parte de los consumidores, sobre los impactos ambientales que produce el uso excesivo de productos químicos y de sus efectos nocivos para la salud humana (VIII Congreso de economistas agrarios, 2003).

El carácter asociativo en la producción del vino da ventajas comparativas a los pequeños y grandes productores, tanto con una valorización del vino a granel como del vino embotellado. En esa perspectiva, el vino orgánico constituye una alternativa interesante que otorga un valor agregado a nuestros vinos en el mercado internacional.

1.2. Antecedentes específicos.

1.2.1. Colorantes en la industria alimentaria y el vino.

Los colorantes alimentarios son compuestos químicos, de origen natural o artificial, que son usados en la industria alimentaria. En el proceso de elaboración industrial, los productos alimentarios suelen tener pérdida del color o simplemente no lo tienen, razón por la cual se le adiciona colorante para hacerlo más agradable a la vista y más atractivo al consumidor. Entonces, para que una sustancia sea considerada colorante, además de poseer color (o desarrollarlo a través de una reacción química) debe poder transferirlo al medio al cual se aplica (Marcano, 2018).

1.2.1.1. Antocianinas como colorante natural en el vino.

Los colorantes naturales son compuestos orgánicos, en su gran mayoría, son obtenidos a partir de plantas, raíces, frutos, cortezas y hojas. Algunos colorantes naturales permitidos en la comunidad europea para la industria alimentaria, categorizados con la letra E, son los carotenoides (E160a), la curcumina (E100), el carmín (E120) y las antocianinas (E163). Las antocianinas son extraídas de diversos frutos como uva, maqui, calafate, acaí, arándanos o frambuesas (García, 2010). En vinos tintos, son encontradas normalmente en concentraciones entre 0,3 – 1,2 g/L (Vidal y col., 2004), en solución son muy inestables y presentan máximos de absorción a 520 nm (Ribéreau-Gayou, 1982; Glories, 1984 b). Su extracción en el curso la fase prefermentativa y de maceración es determinante del estilo y la calidad final del vino, como se evidencia a partir de las correlaciones positivas entre el color y calidad del vino (Jackson y col., 1978; Somers & Verette, 1988).

La malvidina-3-glucósido es la antocianina mayoritaria de la uva (Ribéreau-Gayon, 1959; Baldi y col., 1995; Waterhouse & Ebeler, 1999), y además la más estable en el vino (Glories, 1999); el grupo metilo en la posición C-3 del anillo fenólico B, ejerce una protección contra el ataque nucleofílico del agua sobre la posición C-4 del catión flavilio (Gómez-Cordovés y col., 2003), y evita la formación de radicales a partir de ella (figura 2).

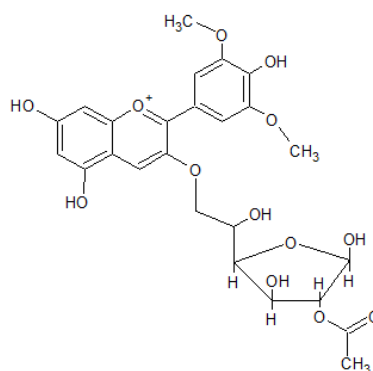


Figura 2: Estructura de la malvidina-3-glucósido; se indica la numeración de las posiciones de la molécula.

1.2.1.2. Colorantes artificiales.

Los colorantes artificiales hacen referencia a compuestos obtenidos mediante síntesis química y que no existen por sí mismos en la naturaleza (SECCO, 2004). Los colorantes artificiales presentan una alta solubilidad, gran gama de colores y son significativamente más económicos que los naturales, por estas razones han sido ampliamente usados en la industria de los alimentos. Los compuestos azoicos que contienen el grupo azo ($R-N=N-R'$), tienen coloración en el rango visible del espectro electromagnético, cuando los grupos R y R' corresponden a anillos aromáticos.

Existen colorantes con el grupo azo en su estructura, ampliamente utilizados en alimentos, dado que son resistentes a cambios de temperatura y exposición a la luz. Un ejemplo de colorante azoico rojo es la azorrubina (E122, Figura 3A), que está clasificada como peligrosa en Europa y prohibida en países como Noruega, Suiza, Japón y Canadá; otros colorantes azoicos ya han sido prohibidos por su alta toxicidad, como son el sudan o el rojo 2G (E128). La ingesta diaria admisible (IDA) de E-122 es de 4 mg/Kg. (Rivera, 2008).

La mezcla de un colorante rojo con uno azul, como la azorrubina con la indigotina (figura 3), genera un tono burdeo, similar al color que presenta el vino tinto varietal. Ambos colorantes están autorizados para su uso en alimentos y bebidas de fantasía en bajas concentraciones. La azorrubina en bajas concentraciones no presenta riesgos mortales para la salud; sin embargo, existen indicios del efecto sinérgico en la hiperactividad en niños, asma y algunos tumores renales (Centro para la Ciencia de interés público, 2008). Por estas razones está prohibido el uso de colorantes artificiales para cambiar o mejorar la apariencia de productos alimentarios considerados naturales como pan, leche o vino (Reglamento (UE) No 1129/ 2011).

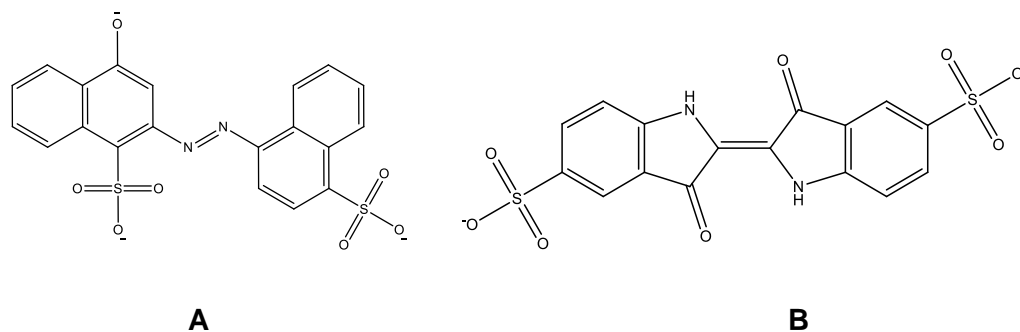


Figura 3. Estructuras químicas de colorantes artificiales: azorrubina (A) e Indigotina (B).

1.2.2. Técnicas de análisis de colorantes.

La técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se utiliza para identificar compuestos mediante la separación de los componentes de una solución utilizando distintos detectores. El procedimiento consiste en una mezcla de compuestos o analitos disueltos en una solución (fase móvil), que es transportada a través de una columna cromatográfica que contiene un material adsorbente (fase estacionaria) permitiendo la separación de los compuestos.

En otros países se han estudiado vinos adulterados con colorantes utilizados en la industria alimentaria. La cromatografía HPLC ha permitido evidenciar la presencia de colorantes artificiales en muestras de vino tinto (Instituto nacional de vitivinicultura de Argentina, 2016). Algunos científicos han estudiado fraudes en el color del vino tinto, por ejemplo, Chen y colaboradores, 2014, encontraron la presencia de siete colorantes alimentarios en vinos mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de masa. De Villiers y colaboradores, 2003, detectaron la presencia de azorrubina en vinos mediante un método acoplando HPLC con electroforesis capilar. Shuo y colaboradores, 2011, detectaron la presencia de sudan en vinos mediante HPLC con microextracción líquido-líquido. Urbano y colaboradores, 2006, utilizaron la espectroscopia UV-Vis para discriminar vinos mediante análisis de componentes principales. Prado y colaboradores (Prado, 2006) detectaron azorrubina, burdeo, ponceau 4R, eritrosina y rojo 40 mediante Electroforesis capilar. Geana y colaboradores, 2016, determinó la calidad del vino por medidas isotópicas de azúcares ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ y $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) y detección de colorantes por HPLC.

En el caso de los colorantes azoicos, los anillos aromáticos absorben la radiación UV-visible, como consecuencia de la excitación de los electrones de enlace, desde un estado basal a un estado excitado, que darán aparición a bandas en el rango UV-vis. Las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$ son medibles por espectrofotometría UV-vis, ya que estas transiciones producen la aparición de bandas de absorción entre 200 y 700 nm. En el caso del vino, la intensidad del color se calcula a 420 y 520 nm (Puras, 1995. Ecuación 1).

$$I = \frac{(A_{420} + A_{520})}{b}$$

Ecuación 1: Intensidad del color (I); **A₄₂₀**: absorbancia a 420 nm; **A₅₂₀**: absorbancia a 520 nm; **b**: 1 cm de espesor de la cubeta.

1.2.2.1. Algunas Figuras de mérito de un método analítico.

Para validar un método analítico se utilizan los parámetros de calidad o figuras de mérito (Valcácer, 1998), algunas son:

Linealidad: Es la capacidad de un método analítico para obtener resultados proporcionales a la concentración de analito. Se aplica regresión lineal utilizando el método de mínimos cuadrados. Con ello, se obtiene el coeficiente de correlación, el cual provee una medida de cómo dos variables aleatorias están asociadas. Entre más cercano sea R^2 a 1, mayor es el ajuste de los datos experimentales.

Sensibilidad: Capacidad de un método analítico para discriminar entre concentraciones semejantes del analito en la muestra o capacidad para poder detectar o determinar pequeñas concentraciones del analito en la muestra. Se determina como la pendiente de la curva de calibración, a mayor pendiente, mayor sensibilidad.

1.2.3. Implicancia en la salud de las personas y el medio ambiente.

Los colorantes azoicos son colorantes sintéticos de los alimentos que constituyen el grupo más variado de colorantes orgánicos disponibles en el mercado y adicionalmente, el más contaminante para el ambiente. Se estima que durante su producción y uso son descargados al ambiente entre el 10 y 15% de estos (Ruíz, 2009).

El vino chileno es considerado de alta calidad en los mercados internacionales, por lo que es relevante evidenciar la adición de colorantes artificiales. La azorrubina ha sido utilizada para adulterar el color del vino tinto (Chen y col. 2014; De Villiers y col. 2003; Prado, 2006), acción que va en contra de una producción amigable con el medio

ambiente y libre de sustancias tóxicas que afectan a los seres humanos. La relevancia ambiental de incentivar una producción natural, en la industria vitivinícola chilena, nos permitirá disminuir los impactos ambientales que producen los aditivos artificiales, pesticidas o fertilizantes sintéticos que son nocivos para la salud humana.

1.2.4. Planteamiento del problema.

En el presente trabajo, se analiza el color del vino tino y sus parámetros químicos como un indicador en la calidad de éste. La metodología se basa en las mediciones de la intensidad del color (UV-Vis), pH, conductividad eléctrica, porcentaje de azúcar y la identificación del contenido de antocianinas mediante HPLC-DAD. Para este método se realizó un análisis de las figuras de mérito como linealidad y sensibilidad, para evaluar la calidad de los resultados para determinar la calidad del vino tinto. Adicionalmente, se realizan ensayos con muestras de vino tinto adicionando azorrubina para mostrar los cambios en la intensidad de color que tengan, respecto de las muestras de vino tinto natural. Estos resultados fueron complementados con la búsqueda de la reglamentación ambiental en la industria vitivinícola para evidenciar los requerimientos ambientales que tendrán a futuro la producción de vino orgánico.

1.3. Objetivo General:

- Determinar la calidad del vino tinto mediante un análisis de intensidad del color, parámetros químicos e identificación de antocianinas.

1.3.1. Objetivos específicos:

- Analizar el color en muestras de vino tinto (embotellado, caja o granel) mediante parámetros químicos como pH, conductividad eléctrica, contenido de glucosa y espectros UV-vis.
- Determinar cambios en la intensidad del color de vino tinto, producto de la adición azorrubina, mediante parámetros químicos como pH, conductividad eléctrica, contenido de glucosa y espectros UV-vis.
- Identificar el contenido de antocianinas como indicador de calidad en muestras de vino tinto mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección de arreglo de diodos.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales.

2.1.1. Reactivos.

Se utilizó colorante alimentario rojo burdeo (Foodcolor), que está compuesto por una mezcla de azorrubina e Índigo, disponible para productos alimenticios; en el colorante rojo burdeo predomina la azorrubina por sobre el índigo. Debe indicar procedencia y calidad de los reactivos

Las muestras de vino tinto corresponden a vinos de bajo costo que están disponibles comercialmente en botella, caja y a granel. Se utilizó vino blanco embotellado y agua nanopura para las diluciones (18 MΩ).

2.2. Análisis de parámetros químicos.

2.2.1. pH y Conductividad eléctrica (CE).

Se registraron los valores de pH y CE directamente en las muestras de trabajo (T, M, C y G), utilizando un pH-metro HANNA Instrument HI10480 (recomendado para muestras de vino) y un conductímetro HANNA Instrument HI763100.

2.2.2. Contenido de Glucosa.

De cada muestra se tomó una gota de solución y se midió su % de glucosa mediante un equipo de refracción HANNA Instrument HI96816 Wine Refractometer, equipo utilizado en la industria vitivinícola.

2.3. Métodos analíticos.

2.3.1. Preparación de muestras UV-vis y HPLC.

Se seleccionaron cinco muestras de vino tinto de bajo costo. Las muestras se clasifican como vino tinto envasado (T), vino tinto envasado diluido con vino blanco (M), vino tinto envasado diluido con vino blanco adicionando azorrubina como colorante artificial (C) y vino tinto a granel (G) de bajo costo. Se prepararon 100 mL de cada una de las muestras. A continuación, se indica el detalle de cada muestra:

- T: Muestras de vino tinto sin adulterar (T1, T2, T3, T4 Y T5).
- M: Muestras de vino tinto diluidas con vino blanco en la proporción de 75/25 expresado en mL (M1, M2, M3, M4, M5).
- C: Muestras de vino tinto diluidas con vino blanco y además con la adición de colorante azorrubina, en una proporción de 75/24/1 expresado en mL (C1, C2, C3, C4, C5).
- Los dos vinos a granel (G1 y G2) fueron analizados como muestras de 100 mL de vino tinto sin adulterar ni diluir.

Se preparó 20 mL de solución concentrada ($5000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de colorante rojo burdeo diluido en vino blanco y otra en agua. A partir de la solución concentrada, se prepararon las siguientes muestras diluidas en concentraciones de 5, 10, 15, 20, 30, 40 y $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; para analizar el comportamiento del colorante en estos medios.

2.3.2. Registros UV-vis y HPLC.

Se realizaron las mediciones en la facultad de ciencias de la Universidad de Chile, en el laboratorio de Espectroscopía vibracional. Las muestras preparadas fueron analizadas mediante un espectrofotómetro UV-5100 Metash con una celda de 1 cm. El barrido espectral se realizó entre los 700 y 400 nm con ancho de rendija de 0,5 nm.

Se realizó la identificación de antocianinas en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile en el laboratorio de Agroindustria y Enología, con un procedimiento basado en el método descrito por Burns y colaboradores, 2002, mediante HPLC con detector de arreglo de diodos. Para la separación de los compuestos se aplicó elusión en gradiente con una columna cromatográfica Lichrosper con fase estacionaria C18 (250-4,6 mm) de 4 µm en fase inversa. Se eluyó durante 45 min con la fase móvil de acetonitrilo/ácido fórmico (5-30%/5%), velocidad de flujo 1 mL/min y se mantuvo a 40°C. Se inyectó una alícuota de 100 µL. Las antocianinas fueron monitoreados a 520 nm e identificadas en base a su orden de elución, tiempo de retención y análisis de absorbancia.

III. RESULTADOS

3.1 Parámetros químicos.

En la literatura, se informa que los vinos blancos presentan valores de pH entre 3,0-3,3 mientras que la mayoría de los vinos tintos entre 3,3-3,6. Cuando se supera el valor de pH 4, el vino tendrá un mayor potencial para presentar problemas microbiológicos como es el crecimiento de bacterias, las cuales se desarrollan óptimamente entre un pH 4,2-4,5 (Peña, 2006).

En este trabajo se registraron los parámetros correspondientes a pH, Conductividad Eléctrica, alcohol potencial y concentración de azúcar. En la tabla N°2 se informan los resultados obtenidos de cada muestra de trabajo.

Tabla 2: Valores registrados de pH, CE, y porcentaje de azúcar en las muestras.

Muestra	Acidez promedio (pH)	DS (pH)	CE (mS cm ⁻¹)	DS (CE)	Alcohol potencial (%V/V)	DS (alcohol potencial)	Azúcar (g/L)
T1	3,18	0,01	3,17	0,02	3,5	0,0	58,9
T2	3,69	0,01	3,93	0,02	4,4	0,0	74,1
T3	3,63	0,02	3,44	0,02	3,9	0,0	65,6
T4	3,37	0,01	2,87	0,02	6,9	0,1	116,1
T5	4,16	0,01	3,85	0,01	4,0	0,0	67,3
M1	3,74	0,03	3,02	0,04	3,7	0,0	62,3
M2	3,79	0,01	3,55	0,01	4,2	0,0	70,7
M3	3,73	0,01	3,14	0,03	3,9	0,0	65,6
M4	3,56	0,01	2,76	0,03	6,1	0,0	102,7
M5	3,99	0,01	3,46	0,02	3,9	0,0	65,6
C1	3,15	0,04	2,86	0,02	3,7	0,1	62,3
C2	3,36	0,03	3,45	0,03	4,0	0,1	67,3
C3	3,33	0,03	3,15	0,02	3,7	0,0	62,3
C4	3,05	0,04	2,76	0,04	5,5	0,0	92,6
C5	3,45	0,03	3,40	0,03	3,7	0,0	62,3
G1	3,61	0,03	2,65	0,02	3,8	0,0	64,0
G2	3,52	0,03	3,13	0,02	3,9	0,0	65,6

En la estabilidad coloidal es relevante la interacción electrostática entre macromoléculas, cuyas fuerzas de atracción y repulsión dependen de las características del medio, como pH y conductividad eléctrica, además de la interacción hidrófoba, siendo importante el grado alcohólico en el caso del vino (Agropec, 2009).

De los resultados obtenidos, se observa que la mayoría de las muestras presentan un pH en el rango normal de los vinos tintos. Las muestras T (vino tinto sin adulterar) presentan valores en el rango de pH esperado para los vinos tintos, salvo T5 con un valor de pH 4,16, que potencialmente tendrá crecimiento de microorganismos que favorecerán su descomposición. La mayoría de las muestras M (vino tinto con dilución de vino blanco) presentan valores sobre del rango de pH de vinos tintos, los vinos blancos presentan un valor de pH más bajo que los vinos tintos por lo que podría acidificar levemente nuestras muestras, sin embargo, esto solo se ve reflejado en las muestras M4 y M5.

Al observar los valores de pH de las muestras C (vino tinto diluido con vino blanco más adición de colorante) se distingue un aumento en la acidez. Tal disminución de pH se atribuye a la dilución en vino blanco y la adición de colorante. Finalmente, las muestras G (vino a granel sin adulteraciones) presentan valores de pH que se encuentran dentro del rango óptimo de acidez.

Al analizar los valores de CE, se observa una leve dispersión entre las muestras de vino. Sin embargo, hay una relación entre cada tipo de vino, que al ir diluyéndose (muestras M) y luego, además de la dilución se le agrega colorante (muestras C), su valor de CE va disminuyendo parcialmente. Por ejemplo, T1 presenta un valor de 3,17 mS cm^{-1} ; luego M1 presenta un valor de 3,02 mS cm^{-1} y en C1 se tiene un valor de 2,86 mS cm^{-1} . Las fuerzas electrostáticas de repulsión disminuyen a mayor concentración y valencia de iones, es decir, a mayor conductividad eléctrica, permitiendo un mayor

acercamiento de los coloides y con ello un aumento de la inestabilidad del vino, por lo que existiría la posibilidad de que sales existentes en el vino precipiten. Según la literatura, los valores de CE en el vino varían entre 1 – 5 mS/cm (Agropec, 2009), lo que indica que los valores obtenidos en las muestras son favorables desde el punto de vista organoléptico, pero no implican una relevancia para el estudio del color en el vino tinto.

La medida actual del índice de refracción es simple y rápida, siendo un método aceptado por la Comunidad económica Europea para el análisis de contenido de azúcar. Los refractómetros digitales son ideales por su rapidez y confiables en el campo de acción de la medición. La curva de alcohol potencial se encuentra establecida en la regulación europea N°2676/90, determinando los métodos para el análisis del vino de la organización internacional del vino.

Al analizar los valores de concentración de azúcar en las muestras de vino tinto, se observa una dispersión en los datos sin ninguna relación evidente entre cada tipo de vino, al ir diluyéndose (muestras M) o al agregar colorante (muestras C).

3.2. Espectros UV-vis.

Se registraron los espectros UV-vis de las muestras de vino tinto. En la figura 4, se observan las muestras T. Cada curva corresponde a un vino distinto donde se especifica a qué longitud de onda se presenta el máximo de absorción de cada muestra.

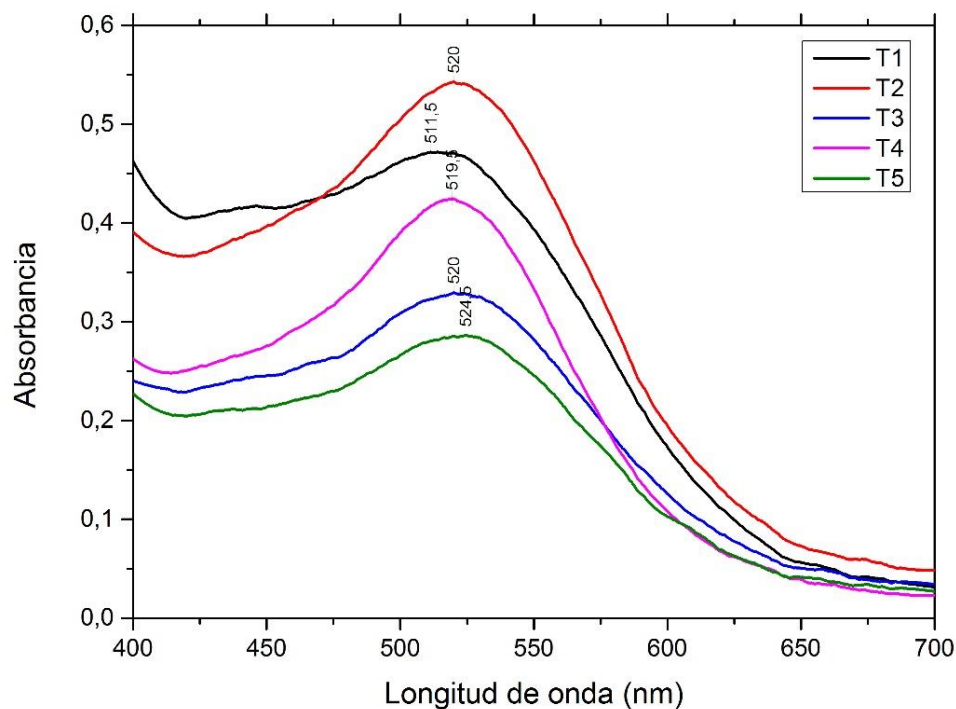


Figura 4: Espectros de absorción UV-vis de muestras de vino tinto de bajo costo (T).

Como se dijo anteriormente, la medición de intensidad de color en el vino se realiza a 520 nm. En este caso es posible observar que la muestra T2 presenta la mayor intensidad de color con un valor de absorbancia de 0,549 a 520 nm. Luego, sigue la muestra T1, T4, T3 y finalmente T5 con su máximo de absorción a 524,5 nm con una intensidad de color de 0,289, correspondiente a la muestra con menor absorbancia.

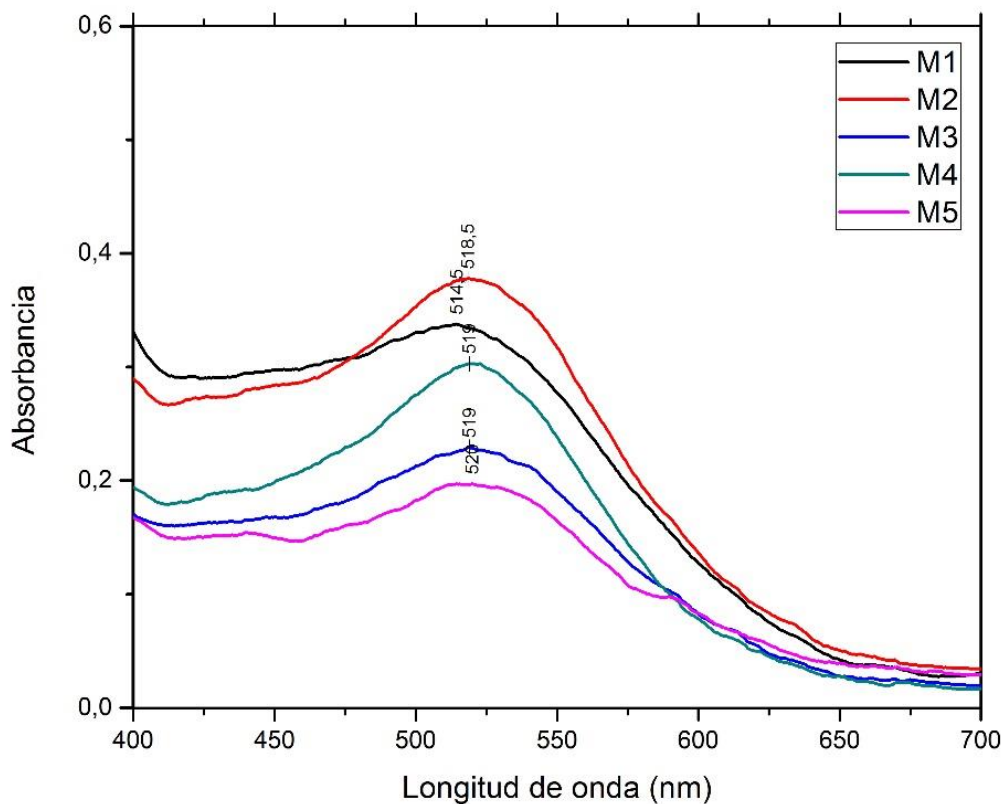


Figura 5: Espectros de absorción UV-vis de muestras de vino tinto diluido con vino blanco (M).

En los espectros UV/vis de las muestras M (Figura 5), se observan variaciones en la intensidad de color (disminución) y en los máximos de longitud de onda respecto de las muestras de vino tinto sin diluir. La muestra M2 presenta su máximo de absorción a 518,5 nm con el valor más alto de absorbancia; 0,382. Al ir disminuyendo la intensidad de color vienen las muestras M1, M4, M3 y M5 con un valor de intensidad de color de 0,198 a los 520 nm.

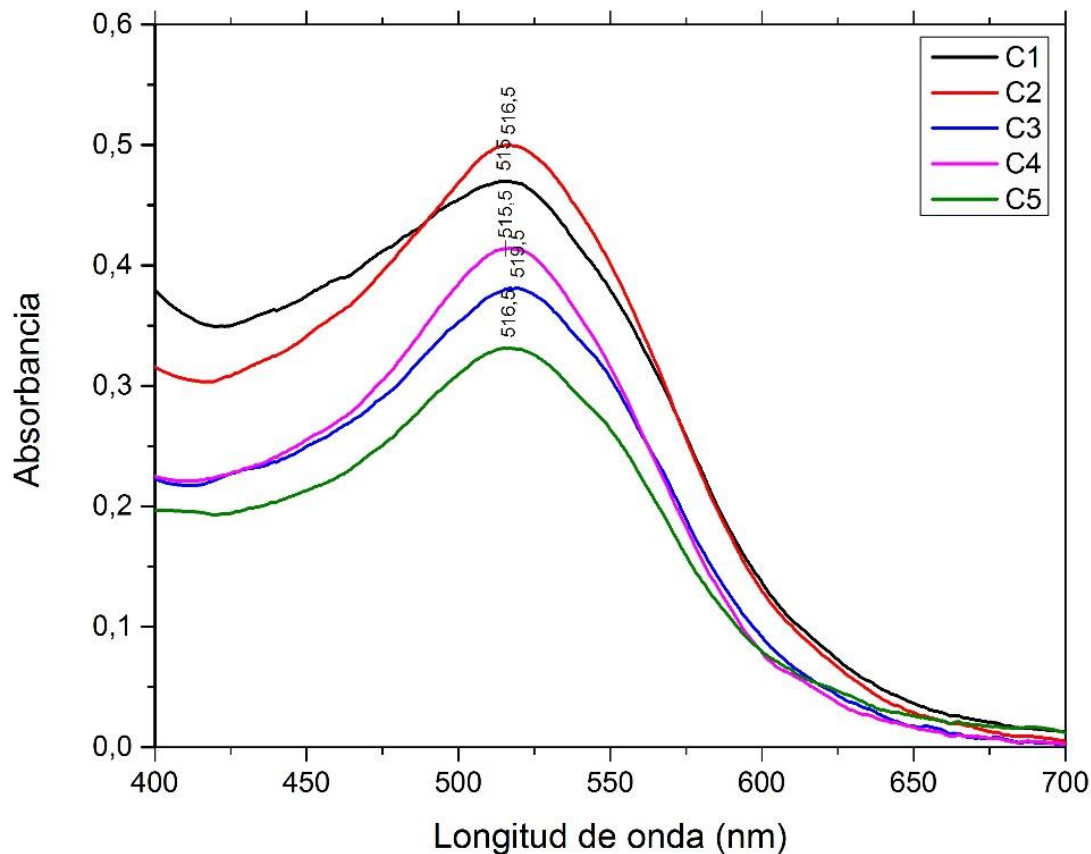


Figura 6: Espectros de absorción UV-vis de muestras de vino tinto diluido con vino blanco más adición de azorrubina (C).

Los espectros UV/vis de las muestras C (Figura 6), muestran un aumento en la intensidad del color y los máximos de absorción ofrecen menos variación respecto de las muestras T y M. La intensidad de color aumentó a valores similares a los obtenidos en las muestras T, lo cual es atribuible a la adición de azorrubina a las muestras de vino tinto diluido. La muestra C2 presenta el valor de absorbancia más alto; 0,547, a una longitud de onda de 516,5 nm, mientras que la muestra C5 presenta la intensidad de color más baja de 0,336 y su máximo de absorción también a los 516,5 nm.

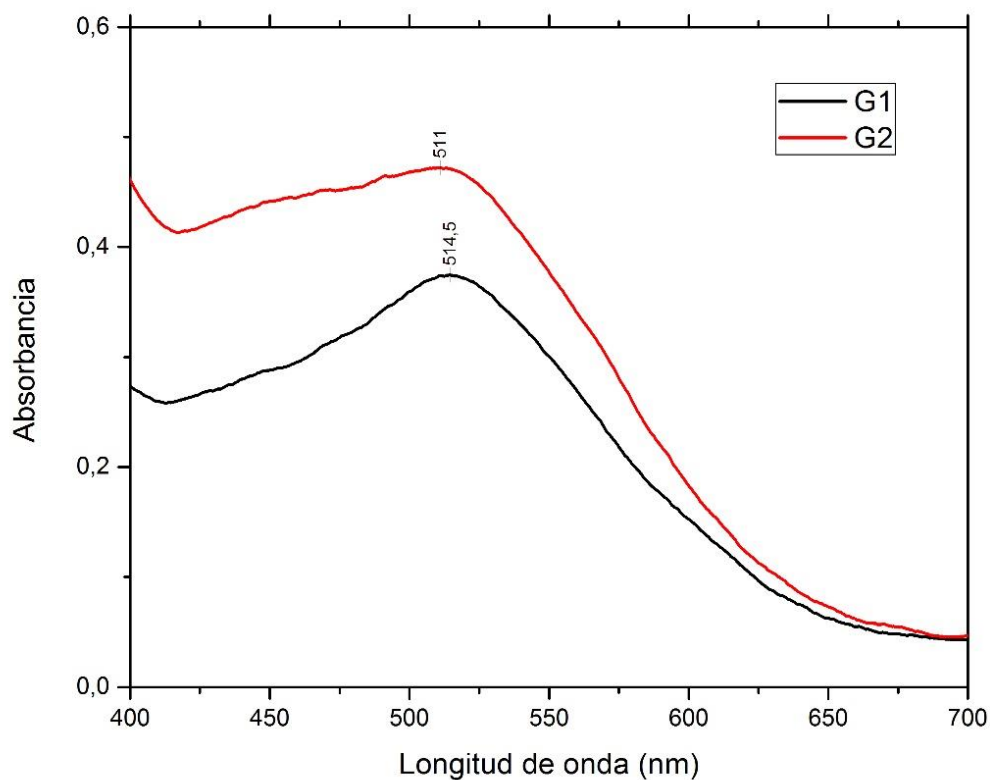


Figura 7: Espectro de absorción UV-vis de muestras de vino tinto a granel (G).

En la Figura 7, se informan los espectros de las muestras G, los cuales presentan valores de intensidad de color de 0,367 (G1) y 0,474 (G2) a 514,5 y 511 nm respectivamente.

Con el fin de observar el comportamiento espectral de la azorrubina, se presentan en las figuras 8 y 9 los espectros UV-vis de las muestras preparadas de este colorante a distintas concentraciones, diluidas en vino blanco y en agua, respectivamente según lo descrito en la sección 2.3.1

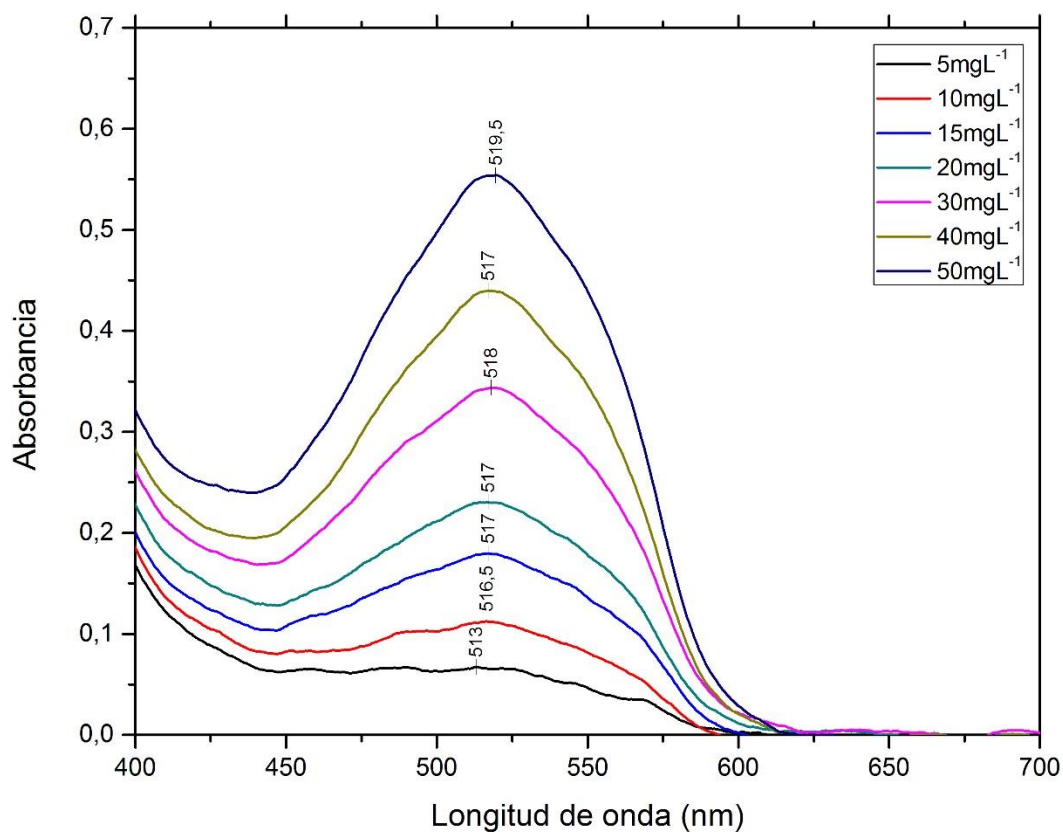


Figura 8: Espectros de absorción UV-vis de soluciones de Azorrubina diluida en vino blanco a distintas concentraciones.

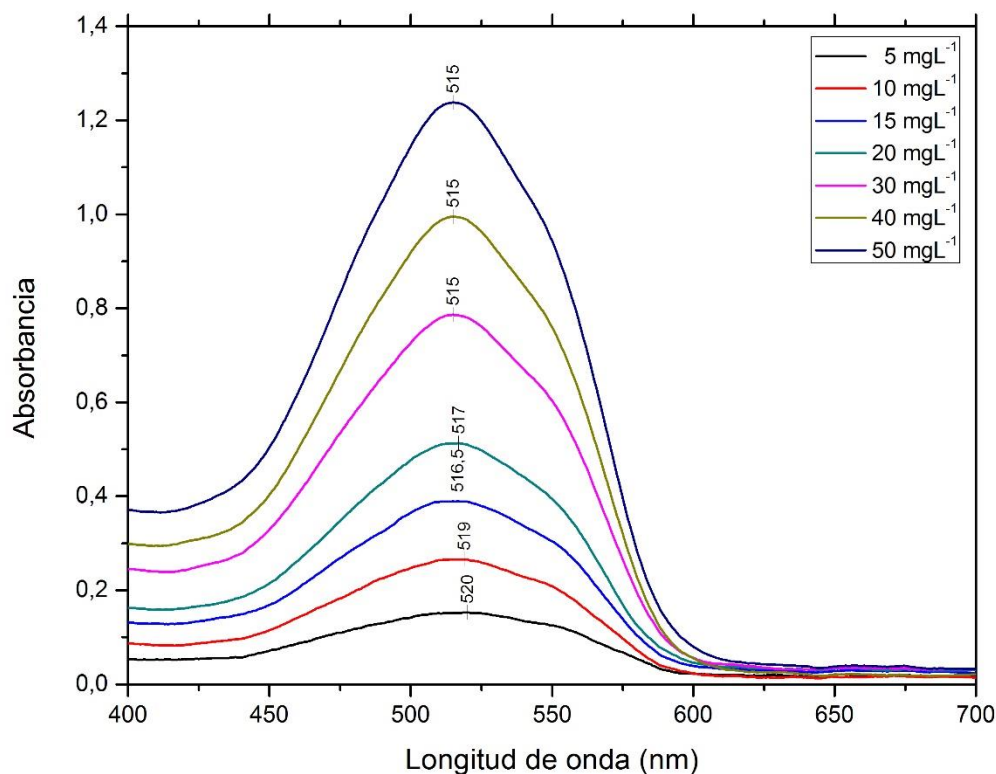


Figura 9: Espectros de absorción UV-vis de soluciones de Azorrubina diluida en agua a distintas concentraciones.

Como es de esperar, la azorrubina presenta un comportamiento diferente según el medio en el que está disuelta. En los espectros de azorrubina disuelta en agua, se puede observar que los valores de intensidad de color son aproximadamente el doble de absorbancia que los valores que se registraron de azorrubina disuelta en vino blanco. Con estos resultados se puede indicar que el medio en el que se encuentre la azorrubina influirá en las posibles interacciones que se puedan crear. Además, la tonalidad del vino blanco puede provocar un apagamiento en el color rojo que la azorrubina entrega a las soluciones.

Adicionalmente, mediante un estudio de Equilibrios de carga y pKa de malvidina-3-glucósido mediante electroforesis (Asenstorfer, 2003) se obtuvo un espectro de UV-vis de una solución estándar de esta antocianina a un pH 3,6 y concentración de 18,53 mg*L⁻¹. Cabe mencionar que las antocianinas en solución son muy inestables y además difícil de encontrar en el comercio de forma pura. Se observa en la figura 10 que el valor de intensidad de color más alto se presenta a una longitud de onda de 520 nm, lo que coincide con las muestras de vino analizadas.

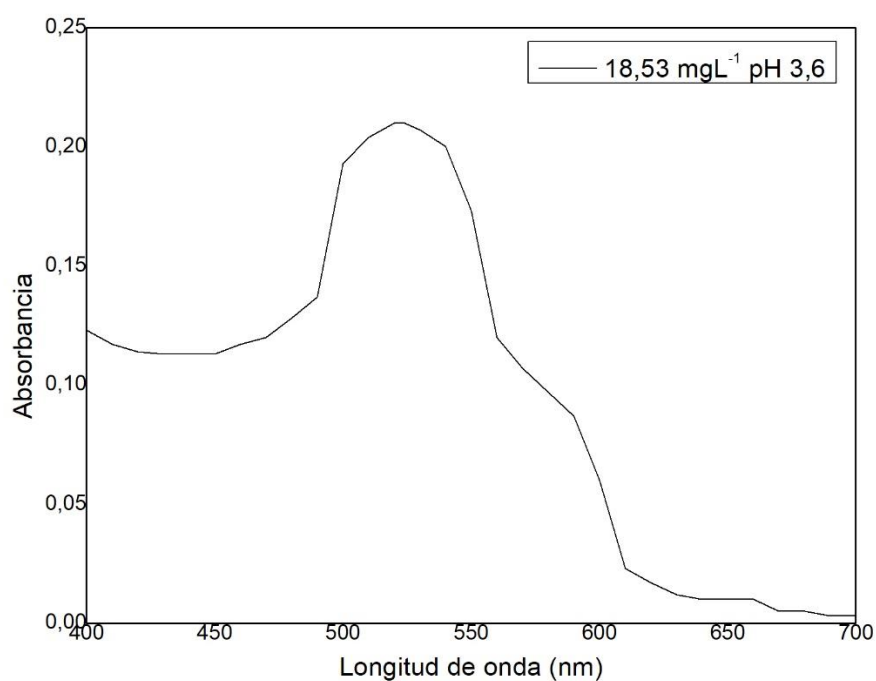


Figura 10: Espectro de Absorción UV-vis de solución estándar de malvidina-3-glucósido.

Se realizaron espectros de absorción UV-vis a cada muestra de vino para observar la intensidad de su color mediante la absorbancia obtenida. La malvidina y la azorrubina en solución etanólica, o vino adulterado, tienen absorciones atribuibles a transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$ de los sistemas aromáticos multicíclicos presentes en sus estructuras. El tono rojo está relacionado con la absorción de luz en la región alrededor de 520 nm. La longitud de onda más baja de colorante azorrubina se asociaría a la presencia de grupos sulfonato, que se usan ampliamente en la industria para aumentar la solubilidad de las moléculas no polares en medios acuosos.

A partir de los valores de absorbancia entregados por los espectros de cada muestra, se calculó el valor de la intensidad del color en el vino según el método de Puras (1995, ecuación 1):

$$I = \frac{(A_{420} + A_{520})}{b}$$

Intensidad del color (I); A_{420} : absorbancia a 420 nm; A_{520} : absorbancia a 520 nm; b : 1 cm de espesor de la cubeta.

A partir de los valores de absorbancia de la muestra T1 se realiza a continuación el cálculo de la intensidad del color en el vino:

$$I = \frac{0,395 + 0,484}{1} = 0,879$$

Los resultados de los valores de intensidad de color de cada muestra se agrupan en la siguiente tabla:

Tabla 3: Resultados cálculo de Intensidad del color.

<i>Muestra</i>	<i>Abs 420</i>	<i>Abs 520</i>	<i>Intensidad</i>
<i>T1</i>	0,395	0,484	0,879
<i>T2</i>	0,360	0,549	0,909
<i>T3</i>	0,234	0,341	0,575
<i>T4</i>	0,254	0,435	0,689
<i>T5</i>	0,204	0,301	0,505
<i>M1</i>	0,284	0,344	0,628
<i>M2</i>	0,271	0,375	0,646
<i>M3</i>	0,157	0,225	0,382
<i>M4</i>	0,177	0,302	0,479
<i>M5</i>	0,142	0,198	0,340
<i>C1</i>	0,354	0,464	0,818
<i>C2</i>	0,196	0,547	0,743
<i>C3</i>	0,094	0,345	0,439
<i>C4</i>	0,238	0,416	0,654
<i>C5</i>	0,203	0,327	0,530
<i>G1</i>	0,261	0,375	0,636
<i>G2</i>	0,416	0,462	0,878

La intensidad del color en el vino hace referencia al grado de opacidad que presentan; dicho de otra forma, al grado en que la luz lo puede atravesar, y está dada por la cantidad de antocianinas que presente la muestra. Mientras mayor sea la cantidad de antocianinas que tenga un vino, la calidad de este también aumentará.

Al calcular el valor de la intensidad del vino, la muestra T2 presenta un valor de 0,909, que corresponde al resultado más alto de intensidad, lo que podría indicar una mayor calidad del vino frente a las otras muestras.

3.3. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y análisis de figuras de mérito.

Se han realizado estudios sobre el perfil de antocianos que presentan los vinos tintos, como por ejemplo el de Kalebek (2011) de donde se obtuvo el cromatograma de la figura 11. En dicha figura, se observa el cromatograma del perfil de un vino con sus respectivas antocianinas y orden en que aparece su señal. Cabe destacar que la Malvidina-3-glucósido (5) presenta la señal más representativa dentro de las antocianinas analizadas.

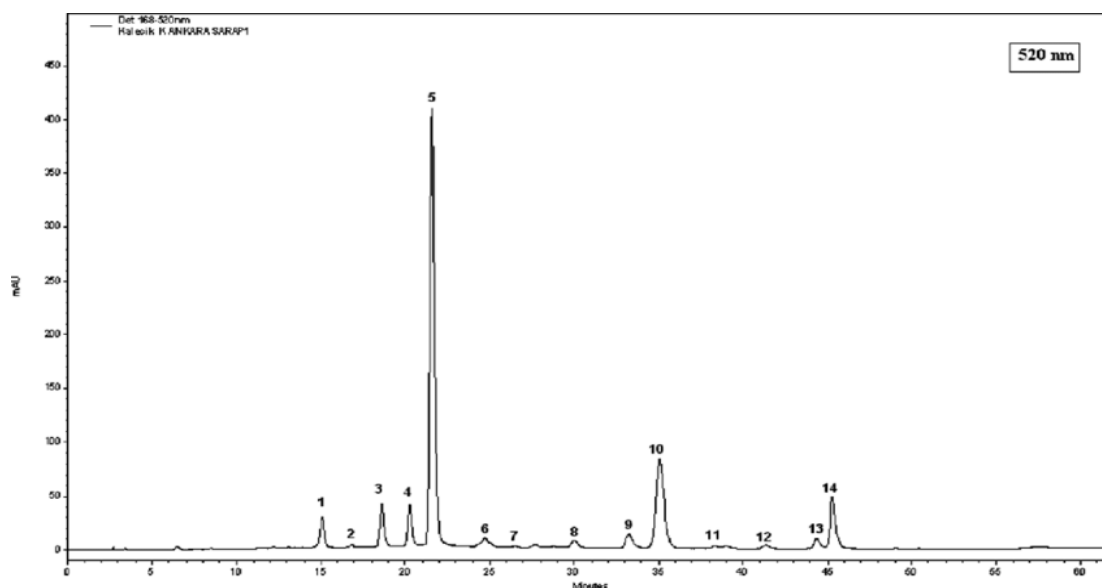


Figura 11: Perfil antocianos. Cromatograma de HPLC de vino (Kalecik karasi), registrados a 520 nm. 1: Delfinidina-3-O-glucósido; 2: cianidina-3-O-glucósido; 3: petunidina-3-O-glucósido; 4: peonidina-3-O-glucósido; 5: malvidina-3-O-glucósido; 6: Delfinidina-3-O-(6-O-acetil)-glucósido; 7: Cianidina-3-O-(6-Oacetil)-glucósido; 8: Petunidina-3-O-(6-O-acetil)-glucósido; 9: peonidina-3-O- (6-O-acetil)-glucósido; 10: Malvidina-3-O- (6-O-acetil)-glucósido; 11: Delfinidina-3-O-(6-Op-cumarilado)-glucósido; 12: Petunidina-3-O-(6-Op-cumarilado)-glucósido; 13: peonidina-3-O- (6-Op-cumarilado) -glucósido; 14: Malvidina-3-O- (6-Op-cumarilado) -glucósido. (Kalebek, 2011).

En este trabajo se obtuvieron cromatogramas a una longitud de onda de 520 nm con la finalidad de identificar y cuantificar las antocianinas presentes en distintas muestras de vino. Al observar los resultados de la tabla 3, se tiene como resultado que la muestra T2 de este estudio es la que presenta el valor más alto de intensidad de color, lo que implicaría una buena calidad para ese vino y por ende un alto contenido de antocianinas. A continuación, se observa el cromatograma del perfil de antocianos de la muestra de vino T2.

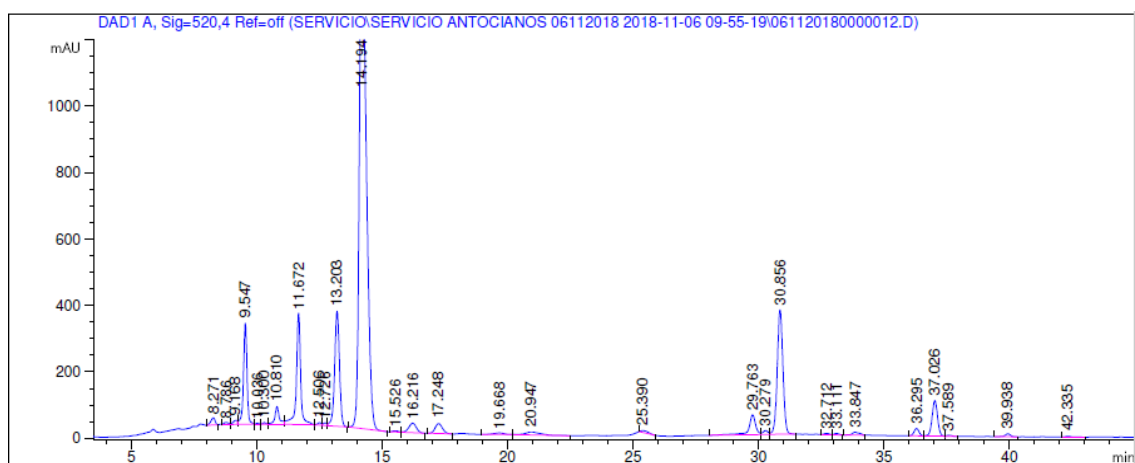


Figura 12: Cromatograma de un perfil de antocianos de la muestra T2. Con elusión en gradiente con una columna cromatográfica Lichrosper con fase estacionaria C18 (250-4,6 mm) de 4 μ m en fase inversa. Se eluyó durante 45 min con la fase móvil de acetonitrilo/ácido fórmico (5-30%/5%), velocidad de flujo 1 mL/min y se mantuvo a 40°C. Se inyectó una alícuota de 100 μ L. Las antocianinas fueron monitoreados a 520 nm e identificadas en base a su orden de elución, tiempo de retención y análisis de absorbancia.

En la figura 12 se puede observar que la señal más alta también corresponde a la Malvidina-3-glucósido (valores de tiempo de retención y áreas en tabla 6 en ANEXO I, además se incluye como ejemplo el cromatograma y datos de la muestra C2).

Para realizar los análisis mediante HPLC se construyó una curva de calibración con soluciones de malvidina-3-glucósido y se obtuvo el siguiente gráfico (Figura 13):

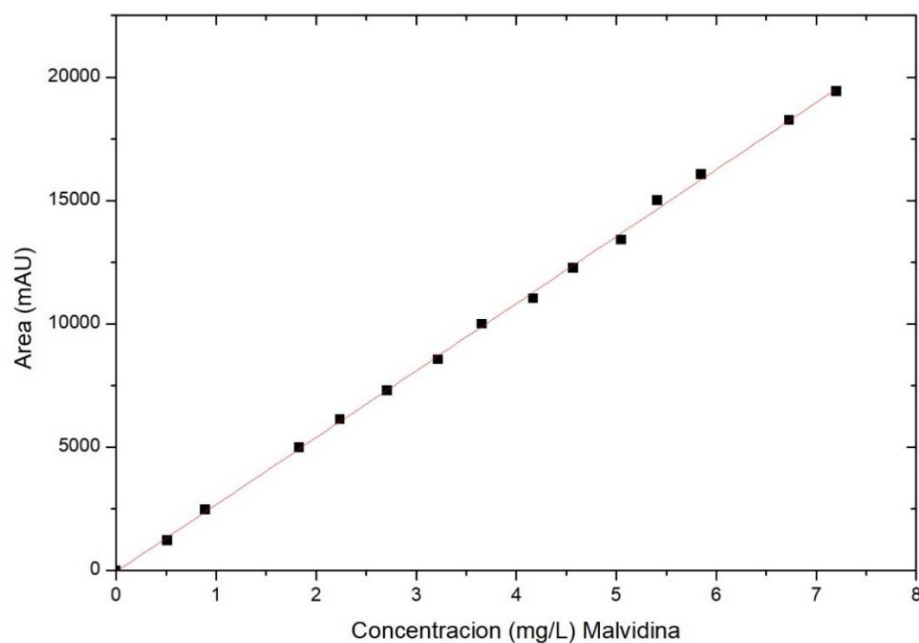


Figura 13: Curva de calibración de malvidina-3-glucósido con ajuste lineal. Con $y = 2,72 * 10^3x - 43,3$; Alicuota de 100 μ L.

A partir de los datos obtenidos, se realizó una regresión lineal utilizando el método de mínimos cuadrados. Con ello, se obtuvo el coeficiente de correlación (R^2), el cual provee una medida de cómo dos variables aleatorias están asociadas. Del ajuste lineal se desprende la siguiente tabla:

Tabla 4: Datos de regresión lineal de curva de calibración.

Ecuación	$y = ax + b^2$		
Adj. R-Cuadrado	0,99919		
		Valor	Error Estándar
Área	Intercepto	-43,30289	86,7623
Área	Pendiente	2716,24618	20,64495

Para R^2 se obtuvo un valor de 0,99919, este valor nos indica la linealidad de los datos obtenidos. Mientras más cercano a 1 sea R^2 mayor es el ajuste lineal de los datos experimentales.

A partir del ajuste lineal, es posible obtener la ecuación de la recta que define la curva de calibración, donde la pendiente corresponde al valor de la sensibilidad del método analítico utilizado.

$$y = mx \pm n$$

$$y = 2,72 * 10^3 x - 43,3$$

Mientras más alto sea el valor de la pendiente mayor será la sensibilidad del método. En este caso, se obtuvo un valor de $m = 2,72 \times 10^3$, siendo un valor cercano a 3000, lo cual indica que el método descrito es altamente sensible a la detección de este analito.

Se realizó un perfil de antocianinas a 17 muestras de vino tinto, para determinar el contenido de antocianinas y encontrar la antocianina principal. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos del análisis de HPLC-DAD realizado en el laboratorio de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile:

Tabla 5: Resultados análisis de HPLC-DAD de antocianinas en muestras de vino tinto.

Valores expresados en mg Equivalentes de Malvidina -3- glucósido/L.

Compuesto*	C1	C2	C3	C4	C5	M1	M2	M3	M4	M5	T1	T2	T3	T4	T5	G1	G2
<i>Dp3GI</i>	2.4	7.7	3.5	4.1	5.5	2.1	7.8	3.8	4.6	5.8	3.0	11.1	5.2	6.6	8.1	1.9	0.6
<i>Cy3GI</i>	ND	1.5	1.3	0.9	2.0	ND	1.9	1.6	0.9	2.2	ND	2.5	1.8	1.0	2.7	ND	ND
<i>Pt3GI</i>	4.7	9.9	6.5	6.1	8.9	3.9	10.8	7.9	6.4	9.3	5.2	14.6	9.3	8.4	12.3	4.0	1.3
<i>Po3GI</i>	2.0	12.4	11.0	7.4	16.8	2.0	13.2	11.9	8.0	17.7	2.6	17.1	15.2	10.5	23.7	1.8	ND
<i>Mv3GI</i>	23.0	82.8	46.8	67.1	60.8	25.1	86.6	49.4	73.0	64.1	33.4	112.1	66.3	94.6	85.5	41.9	ND
<i>Dp3acGI</i>	ND	ND	ND	ND	1.3	0.4	1.7	0.8	1.0	1.3	ND	ND	1.1	1.4	1.8	ND	ND
<i>Cy3acGI</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Pt3acGI</i>	ND	1.4	1.1	0.9	1.6	0.4	2.1	1.2	1.3	1.7	ND	2.1	1.6	1.7	2.2	ND	ND
<i>Po3acGI</i>	ND	4.1	2.8	2.4	3.5	2.2	3.2	2.3	1.9	2.8	1.7	4.2	3.1	2.4	3.9	2.4	0.4
<i>Mv3acGI</i>	4.9	16.5	6.8	13.4	9.2	5.3	17.2	7.5	14.7	10.0	6.9	21.7	10.2	19.1	13.6	1.6	0.3
<i>Dp3acCum</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Cy3acCum</i>	ND	0.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.2	ND
<i>Pt3acCum</i>	0.3	0.6	0.3	0.3	0.4	ND	0.6	0.3	0.6	0.5	0.3	0.7	0.4	0.7	0.5	0.5	ND
<i>Po3acCum</i>	0.3	1.0	0.7	0.6	1.1	0.3	1.0	0.7	0.7	1.1	0.5	1.2	0.9	0.8	1.4	0.2	ND
<i>Mv3acCum</i>	1.4	4.6	2.8	4.1	3.5	1.5	4.8	3.0	4.4	3.7	1.9	6.0	3.9	5.7	4.8	1.5	0.3
<i>Total</i>	39.9	142.8	83.8	107.2	114.4	43.2	150.9	90.4	117.5	120.2	55.6	193.4	119.1	153.0	160.5	55.8	2.9

*Donde: *Dp3GI*: Delfinidina-3-glucósido; *Cy3GI*: Cianidina-3-glucósido; *Pt3GI*: Petunidina-3-glucósido; *Po3GI*: Peonidina-3-glucósido; *Mv3GI*: Malvidina-3-glucósido; *Dp3acGI*: Delfinidina-3-glucósido-acetilado; *Cy3acGI*: Cianidina-3-glucósido-acetilado; *Pt3acGI*: Petunidina-3-glucósido-acetilado; *Po3acGI*: Peonidina-3-glucósido-acetilado; *Mv3acGI*: Malvidina-3-glucósido-acetilado; *Dp3acCum*: Delfinidina-3-glucósido-cumarilado; *Cy3acCum*: Cianidina-3-glucósido-cumarilado; *Pt3acCum*: Petunidina-3-glucósido-cumarilado; *Po3acCum*: Peonidina-3-glucósido-cumarilado; *Mv3acCum*: Malvidina-3-glucósido-cumarilado; ND: No Detectado.

Cabe mencionar, que el método descrito por Burns y colaboradores, 2002, mediante HPLC con detector de arreglo de diodos es un método validado mediante sus figuras de mérito para la cuantificación de antocianinas en muestras de vino.

Este estudio entrega una cuantificación de las antocianinas en las soluciones de vino tinto, donde se muestra que la principal contribución la hace la malvidina-3-glucósido (Mv3GI). Su concentración en las muestras de vino varía entre los 23 – 112 mgL⁻¹. Al diluir las muestras y/o adulterarlas con colorante su concentración se ve disminuida (muestras M y C respectivamente).

El análisis de HPLC – DAD estandarizado para muestras de vino tinto, muestra un amplio perfil de antocianinas, con los valores de concentración más altos en Mv3GI, pero además se detectaron sus formas sustituidas (glucosiladas, acetiladas y cumariladas) y es esta diversidad de compuestos lo que dificulta este trabajo.

En este caso, no se detectan muestras coloreadas artificialmente, solo es factible observar la variación en la concentración de antocianinas en cada vino. Por lo tanto, si existe una baja concentración de Mv3GI podría indicar que la muestra de vino presenta una baja calidad, debido a que la cantidad de antocianinas totales en los vinos se encuentran en concentraciones entre 0,3-1,2 g/L normalmente (Vidal, 2004).

A partir de lo anterior, es posible inferir que la malvidina al interactuar con otros compuestos, en este caso azorrubina, conlleva a una pérdida en la intensidad del color de las muestras. En el caso contrario, la azorrubina no se ve afectada por la interacción con Mv3GI.

Finalmente, el análisis de HPLC – DAD confirmó que la Mv3GI es la antocianina más representativa en el vino.

Se puede hacer un análisis matemático para analizar las diferencias y la proporcionalidad entre los datos de absorbancia medidas y los valores de concentración de Mv3GI mediante un cálculo de pendientes entre puntos de una recta y este valor se compara con la pendiente de un ajuste lineal, en este caso tomaremos como ejemplo a las muestras M.

Al realizar un gráfico, en este caso de concentración de antocianinas en función de su absorbancia a 520 nm, se puede hacer una regresión lineal para observar la dispersión de los datos. Al hacer el ajuste lineal, se espera que los datos mantengan una concordancia entre ellos, es decir, si aumenta la concentración de antocianinas se espera que la intensidad del color de las muestras también aumente y viceversa. Para analizar este comportamiento se realizó el gráfico de la figura 14.

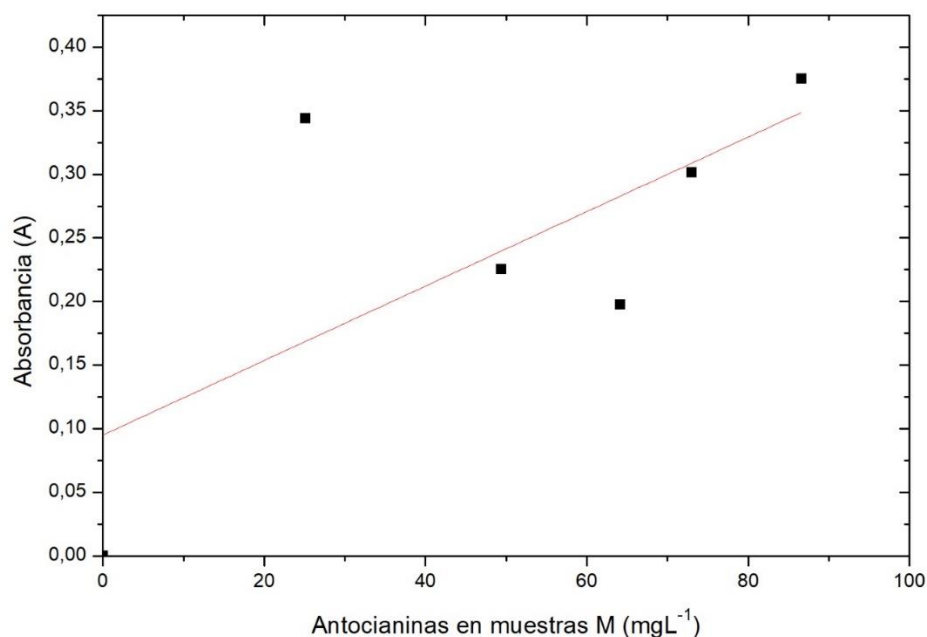


Figura 14: Ajuste lineal de concentración de antocianinas (mgL⁻¹) versus absorbancia a 520 nm (A), $y = 0,0029x + 0,095$, $R^2 = 0,35$.

En la figura 14, se muestra una gráfica de concentración de antocianinas para las muestras M en función de la absorbancia registrada a 520 nm. Se obtuvo un $R^2 = 0,35$ lo que indica que la linealidad de los datos es muy baja. Se hace esta relación para poder analizar mediante un ajuste lineal la pendiente de los datos, que en este caso corresponde a 0,0029. La pendiente de una recta también se describe de la siguiente manera:

$$\frac{\Delta Y}{\Delta X} = \frac{\Delta ABS}{\Delta mgL^{-1}}$$

Ecuación 2: Pendiente de una recta.

En este caso, corresponde al cociente entre la variación de absorbancia a 520 nm y la concentración de antocianinas de las muestras M en mgL^{-1} . Si se toman los valores de M1 y M2, y se reemplazan en la ecuación de la figura 14 se obtiene la siguiente pendiente:

$$\frac{\Delta Y}{\Delta X} = \frac{0,3752 - 0,3439}{86,6 - 25,1} = 5,09 \times 10^{-4}$$

La pendiente de $5,09 \times 10^{-4}$ es un valor más bajo respecto de la pendiente del ajuste lineal, 0,0029, lo que indica que la variación de absorbancia tiene un valor pequeño en relación con el valor de la variación de la concentración de antocianinas. Esto indica que para la concentración de antocianinas registrada el valor de absorbancia no se corresponde con el valor requerido para estar dentro de la recta de la regresión lineal. Si se toman los valores de M4 y M5, la pendiente resulta de la siguiente forma:

$$\frac{\Delta Y}{\Delta X} = \frac{0,1976 - 0,3016}{64,1 - 73,0} = 0,012$$

Se obtiene una pendiente de 0,012. Con este valor se realiza el análisis de que la variación de absorbancia presenta un valor más alto en relación con la variación de concentración de antocianinas y por eso se obtiene un valor más elevado que el entregado por el ajuste lineal.

IV. DISCUSIÓN GENERAL

Históricamente, la calidad de los vinos tintos está asociada al color que presentan. Mediante el estudio de los parámetros químicos, como pH, CE y porcentaje de azúcar, se obtuvieron resultados que confirman que los vinos tintos deben presentar valores específicos para mantener su estabilidad, como lo es el vino blanco que necesita estar dentro del rango de pH de 3,0-3,3 o el vino tinto en el rango de 3,3-3,6, y así sus propiedades químicas no se vean afectadas. Sin embargo, respecto de la calidad, los parámetros químicos estudiados no entregan una información que nos permita decir si un vino es de buena o mala calidad.

Al analizar los espectros UV-vis de las muestras de vino tinto, en las figuras, cada curva representaba un vino distinto y se puede observar que las curvas de las muestras de vino 1, se salen del comportamiento que siguen las curvas de los otros vinos, ya sea si está sin adulterar (T), diluido (M) o diluido más la adición de azorrubina (C).

Las curvas de los vinos a granel (G) muestran un comportamiento similar a las curvas del vino 1, correspondiente a una muestra de vino embotellado, lo que permite cuestionar su calidad, ya que, por conocimiento general, un vino embotellado debería tener una mayor calidad respecto de un vino a granel. Si se analizan respecto a la intensidad del color a 520 nm, presentan valores de absorbancia similares entre 0,4-0,5.

En las curvas de la figura 6, a las muestras de vino tinto diluidas con vino blanco se le adicionó la cantidad de azorrubina necesaria para aumentar su intensidad de color a los mismos valores de absorbancia de las muestras de la figura 4. Sin embargo, a pesar de tener valores de absorbancia similares, en los resultados de los análisis de HPLC – DAD la cuantificación de antocianinas en las muestras C es menor respecto de

las muestras T y M. Esto podría explicarse por la dilución con vino blanco, ya que, al disminuir el color en las muestras de vino, disminuye la cantidad de antocianinas en las soluciones. Pero si fuese así debería mostrar el mismo valor que las muestras M y aun así los resultados de las muestras C tienen valores más bajos, por lo que la azorrubina sería responsable de esta disminución de antocianinas, en este caso de malvidina-3-glucósido (Mv3GI).

Al observar el comportamiento de la azorrubina en vino blanco y medio acuoso, se observa que en agua se necesita una menor concentración de colorante para intensificar su color que en vino blanco. Esto se podría atribuir al efecto solvente en la absorción ya que la presencia de alcohol causa un efecto espectral en conjunto con todos los compuestos orgánicos naturales del vino. Esto indica que al tener una mezcla a pH 3,6 de agua/alcohol la intensidad de la azorrubina es menor que si estuviera en una solución de agua a pH 3,6, por lo que es necesario agregar una mayor cantidad de azorrubina si se requiere intensificar el color en el vino, lo que resulta perjudicial para la salud de las personas. Cabe mencionar que la IDA de azorrubina es de 4 mg/Kg, una ingesta superior a esta podría provocar alteraciones a corto y largo plazo en la salud de las personas, ya que existen indicios del efecto sinérgico en la hiperactividad en niños, asma y algunos tumores renales (Centro para la Ciencia de interés público, 2008). Además, se prohíbe su adición para cambiar o mejorar la apariencia de productos alimentarios considerados naturales como vino, pan o leche (Reglamento (UE) N°1129/2011).

Los análisis de HPLC – DAD entregan una cuantificación de antocianinas en las muestras de vinos. T2 presenta la cantidad más alta de antocianinas, 112,1 mg equivalentes de Mv3GI, mientras que en G2 no se encontró una cantidad detectable de

antocianinas. Con este resultado se puede inferir que el vino de la muestra G2 podría estar adulterado, ya que presenta una absorbancia de 0,4833, pero al no contener una cantidad representativa de Mv3GI, su intensidad es atribuible a la adición de colorante, o bien, algún otro compuesto estaría entregándole el color.

La cantidad de antocianinas en una solución es indicio de buena o mala calidad en un vino. Se observa los resultados anteriores, notamos que los valores de las pendientes calculadas para cada punto muestran valores que se salen del ajuste lineal de la recta, es decir, la dependencia entre los valores de cada eje presenta resultados con un comportamiento no lineal. Esto nos indicaría la posible adulteración en muestras de vino tinto por la presencia de colorante, ya que los valores de antocianinas y absorbancia no se condicen con los valores que nos indica la regresión lineal.

V. CONCLUSIONES

- Los parámetros químicos estudiados indican que las muestras de vino analizadas presentan las propiedades organolépticas adecuadas para el consumo, como un pH óptimo (3,3 - 3,6), una CE con valores entre 1 – 5 mS/cm y una concentración de azúcar aceptada en el mercado. Sin embargo, dichos parámetros no entregan información relevante para catalogar los vinos como de buena o mala calidad.
- A partir de los análisis mediante UV-vis se obtuvo valores de absorbancia, los cuales se asocian a la intensidad del color del vino, permitiendo realizar un estudio de calidad a través de éstos. Sin embargo, el color del vino tinto está dado por la cantidad de antocianinas que este contenga, por lo que realizar este análisis por sí sólo podría resultar insuficiente. Cabe señalar que la muestra de vino tinto con mayor intensidad de color fue T2 con 0,909 y la de menor intensidad fue M5 con 0,340.
- Con la finalidad de robustecer esta metodología, se realizó un análisis de HPLC – DAD que indicó la presencia de antocianinas en las muestras de vino tinto, encontrando la malvidina-3-glucósido (Mv3GI) como la antocianina más representativa del vino tinto. Comparando los análisis cromatográficos con los espectrofotométricos (intensidad del color), se observa que no es posible considerar de manera individual la intensidad del color como indicador de la calidad de los vinos ya que, como queda evidenciado en las muestras C, un aumento en la absorbancia sin un aumento en la cantidad de antocianinas solo podría evidenciar la presencia de un colorante artificial en las muestras de vino tinto, que para este caso corresponde a azorrubina.

- De acuerdo con las figuras de mérito del método de HPLC-DAD, este es adecuado para el análisis de antocianinas en vinos.
- Finalmente, se puede concluir que la muestra T2 es la que presenta una mejor calidad respecto a las demás debido a que su valor de intensidad de color es el más alto (0,909) al igual que la cantidad de antocianinas encontradas en su composición (112,1 mg*L⁻¹).

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agropec, C. C. ESTABILIDAD COLOIDAL DE VINO SAUVIGNON BLANC. *Agro-Ciencia*, 25, 2.

Aguilera-Otíz, M., del Carmen Reza-Vargas, M., Chew-Madinaveita, R. G., & Meza-Velázquez, J. A. 2011. Propiedades funcionales de las antocianinas. *Biotecnia*, 13(2), 16-22.

Asenstorfer, RE, Iland, PG, Tate, ME y Jones, GP (2003). Equilibrios de carga y pKa de malvidina-3-glucósido por electroforesis. *Bioquímica analítica*, 318 (2), 291-299.

Asociación de economistas agrarios A.G. 2003. VIII Congreso de economistas agrarios. <http://www.aeachile.cl/wp-content/uploads/2017/07/VIII-Congreso-de-Economistas-Agrarios-1.pdf#page=337>

Badui Dergal, S. (2006). *Química de los alimentos*. Pearson educación. Cuarta edición. 9: 536-539.

Baldi, A.; Romani, A.; Mulinacci, N.; Vincieri, F.; Casseta, B. 1995. HPLC/MS application to anthocyanins of *Vitis vinifera* L. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 43. 2104-2109.

Brosseau, C.L. et al., 2009. Surface-enhanced Raman spectroscopy: a direct method to identify colorants in various artist media. *Analytical chemistry*, 81(17), 7443–7447.

Burns, J., Mullen, W., Landrault, N., Teissedre, P. L., Lean, M. E., & Crozier, A. (2002). Variations in the profile and content of anthocyanins in wines made from Cabernet Sauvignon and hybrid grapes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(14), 4096-4102.

Casassa, F., Sari, S., Avagnina, S., Días, M., Jofré, V., Fanzone, M., & Catania, C. (2007). Influencia de dos técnicas de maceración sobre la composición polifenólica, aromática y las características organolépticas de vinos cv. Merlot. *Revista Internet de Viticultura y Enología*, 4(3), 1-14.

Centro para la ciencia de interés público, 2008. CSPI Urges FDA to Ban Artificial Food Dyes Linked to Behavior Problems. Dyes Called "Secret Shame" of Food Industry and Regulators. <https://cspinet.org/new/200806022.html>

Chen et al. 2014. Fast determination of seven synthetic pigments from wine and soft drinks using magnetic dispersive solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tándem mass spectrometry.

Comisión Nacional de Agricultura Orgánica 2007. Que es la agricultura orgánica. <http://cnao.odepa.cl/sobre-agricultura-organica/que-es-agricultura-organica/>

De Pascual-Teresa S., Sánchez-Ballesta M. T. 2008. Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemical Review*, 7: 281-299

De Villiers, A., Lynen, F., Crouch, A., & Sandra, P. (2003). A robust capillary electrophoresis method for the determination of organic acids in wines. *European Food Research and Technology*, 217(6), 535-540.

Fennema O. 1993. Química de los Alimentos. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España.

García, J. (2010). Lista de los aditivos permitidos actualmente en la Unión Europea y sus números E., 3. *Recuperado de <http://histolii.ugr.es/EuroE/NumerosE.pdf>*.

Geana, EI, Popescu, R., Costinel, D., Dinca, OR, Ionete, RE, Stefanescu, I., y Bala, C. (2016). Clasificación de vinos tintos utilizando marcadores adecuados junto con análisis estadístico multivariante. *Química de los alimentos*, 192, 1015-1024.

González-Neves G., Balado J., Barreiro L., Bochicchio R., Gatto G., Gil G., Ferrer M. 2003. Efecto de algunas prácticas de manejo del viñedo y de la vinificación en la composición fenólica y el color de los vinos tintos. *Congreso Brasileiro de Viticultura e Enologia. Bento Goncalves, Brasil* 3-5.

Gutierrez, J. B. (2000). *Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos*. Ediciones Díaz de Santos. 9: 177-186.

Instituto nacional de vitivinicultura. 2016. Detección de materias colorants no permitidas en vinos por HPLC. http://www.inv.gov.ar/inv_contenidos/pdf/comunicacion/Investigaciones/2-ColorantesNoPermitidosEnVino.pdf

Jackson et al., 1978. Red wine quality: Correlations between colour, aroma and flavour and pigment and other parameters of young Beaujolais. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 29: 715-727.

Kelebek, H., Canbas, A., Jourdes, M. y Teissedre, PL (2011). Determinación de HPLC-DAD-MS de compuestos fenólicos coloreados e incoloros en vinos Kalecik karasi: Efecto de diferentes ubicaciones de viñedo. *Cartas analíticas*, 44 (6), 991-1008.

Konczack I., Zhang W. 2004. Anthocyanins more than Nature's Colours. *Journal Biomedical and Biotechnology*, 5:239-24

Ley N°20.089, 21 de Diciembre de 2005, Crea Sistema Nacional de Certificación de productos orgánicos agrícolas. Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. <https://www.leychile.cl/Navegar?idNorma=246460>

Marcano, D. (1990). *Introducción a la química de los colorantes*. Reverte Venezolana.

Peña, A. (2006). El color de los vinos. *Revista Vendimia. Enero-Febrero*, 24-26.

Prado 2006. Validation of methodology for simultaneous determination of synthetic dyes in alcoholic beverages by capillary electrophoresis. Journal of Chromatography A, Volume 1136.

Reglamento UE n° 1129/2011 de la Comisión, de 11 de noviembre de 2011 , por el que se modifica el anexo II del Reglamento CE n° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión Texto pertinente a efectos del EEE. <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1129/oj>

Reglamento UE n° 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de diciembre de 2013, por el que se crea la organización común de mercados de los productos agrarios y por el que se derogan los Reglamentos CEE n° 922/72, CEE n° 234/79, CE n° 1037/2001 y CE n° 1234/2007. <http://data.europa.eu/eli/reg/2013/1308/oj>

Reglamento CE n° 1234/2007 del Consejo, de 22 de octubre de 2007, por el que se crea una organización común de mercados agrícolas y se establecen disposiciones específicas para determinados productos agrícolas (Reglamento único para las OCM). <http://data.europa.eu/eli/reg/2007/1234/oj>

Reglamento UE 2018/848 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de mayo de 2018, sobre producción ecológica y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el Reglamento CE n° 834/2007 del Consejo. <http://data.europa.eu/eli/reg/2018/848/oj>

Reglamento CE No 606/2009 de la comisión de 10 de julio de 2009 que fija determinadas disposiciones de aplicación del Reglamento CE no 479/2008 del Consejo en lo relativo a las categorías de productos vitícolas, las prácticas enológicas y las restricciones aplicables. <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/606/oj>

Ribéreau-Gayon, P. 1982. The anthocyanins of grapes and wines. In: *Anthocyanins as Food Colors*. Edited by Pericles Markakis, Academic Press Inc., New York, p.209-244.

Ribéreau-Gayon, 1959; Recherches sur les anthocyanes des végétaux. Application au genre *Vitis*. Thèse Doctorat. Université de Bordeaux. 103 pp.

Rivera, V. M. R. (2008). *Bases de la Alimentación Humana*. Netbiblo. 2(4). 274-279.

Ruíz, Á. A., & Giraldo, L. F. G. (2009). Remoción del colorante azoico amaranto de soluciones acuosas mediante electrocoagulación. *Revista Lasallista de investigación*, 6(2), 31-38.

S.V. Miguel Torres S.A. (2018). Política de sostenibilidad y comercio justo <https://www.migueltorres.cl/wp/wp-content/uploads/2018/05/politica-de-sostenibilidad.pdf>

Santamaría P., Tenorio C., Sota C., Garijo P., Gutiérrez A., López R. 2004. Influencia del pH de la uva en la calidad del vino y en la formación de aminas biógenas. *Zubía*, (16), 69-81.

SECCO, A. 1994. Colorantes sintéticos y naturales para uso en alimentos, *Revista de la Sociedad Chilena de tecnología en alimentos*, 19(3): 31-39.

Shipp J., Abdel-Aal S. M. 2010. Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients. *The Open Food Science Journal*, 4: 7-22.

Shuo Sun et al. 2011. Determination of sudan dyes in red wine and fruit juice using ionic liquid-based liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography.

Somers, T; Verette, E. 1988. Phenolic composition of natural wine types In: Modern Methods of Plant Analysis, Wine Analysis, Edited by Linskens, H.F., & Jackson, J.F., Springer-Verlag, Berlin. 219-257.

Urbano, 2006. Ultraviolet–visible spectroscopy and pattern recognition methods for differentiation and classification of wines. *Food chemistry*, volumen 97.

Valcárcel, M; Gómez, A.1998. Técnicas analíticas de separación. Editorial reverté. Cap. 8.

Vidal, S.; Francis, L.; Noble, A.; Kwiatkowski, M.; Cheynier, V.; Water, E. 2004. Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Analytica Chimica Acta*, 513: 57-65.

Waterhouse & Ebeler, 1999. Phenolic composition as related to red wine flavor. ACS Symposium series. In: *Chemistry of wine flavor*, 10: 124-141.

ANEXO I

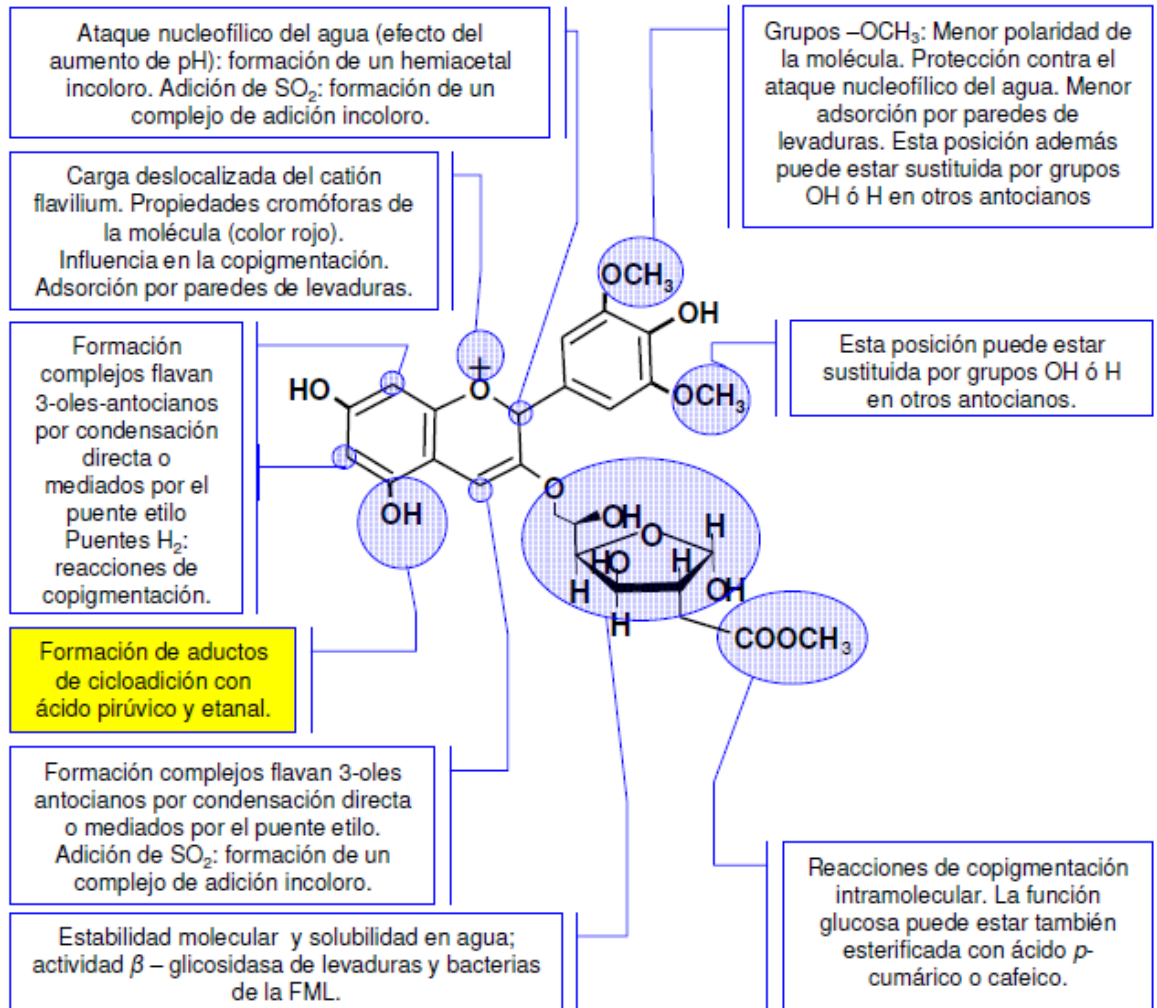


Figura 15: Influencia estructural de la malvidina 3-O-(6-O-*p*-acetil)-glucósido en la evolución y estabilidad potencial del color del vino. (Casassa & Catania, 2006).

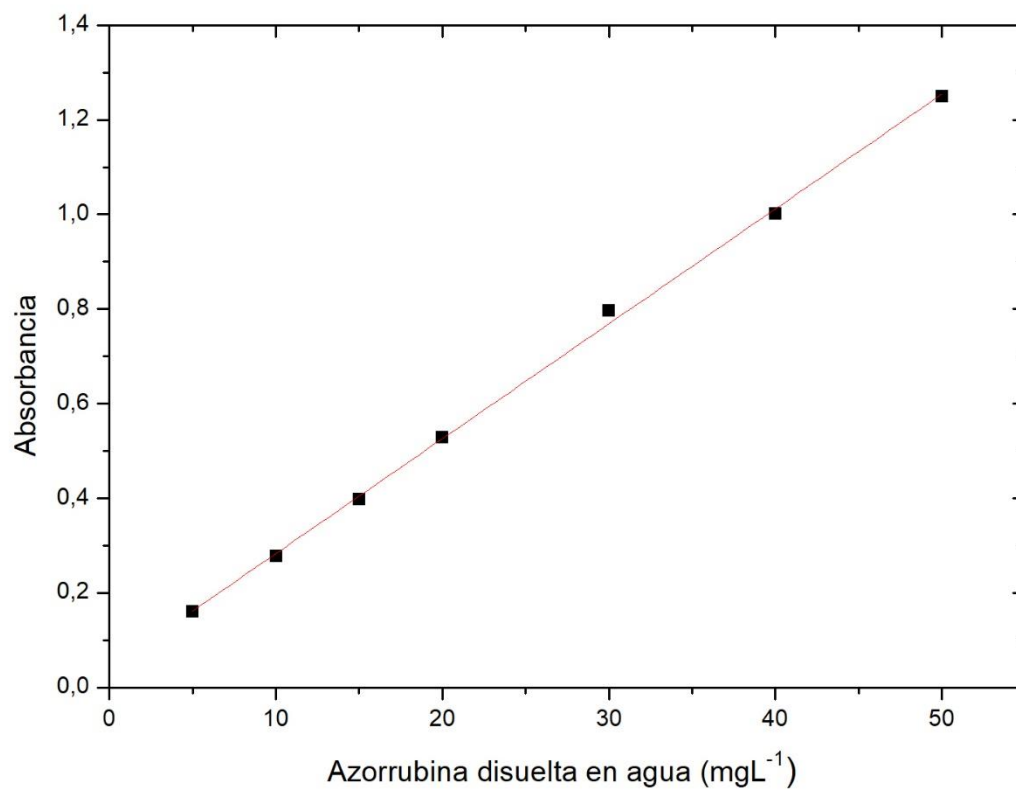


Figura 16: Ajuste lineal de concentración de azorrubina disuelta en agua (mgL⁻¹) versus absorbancia a 520 nm.

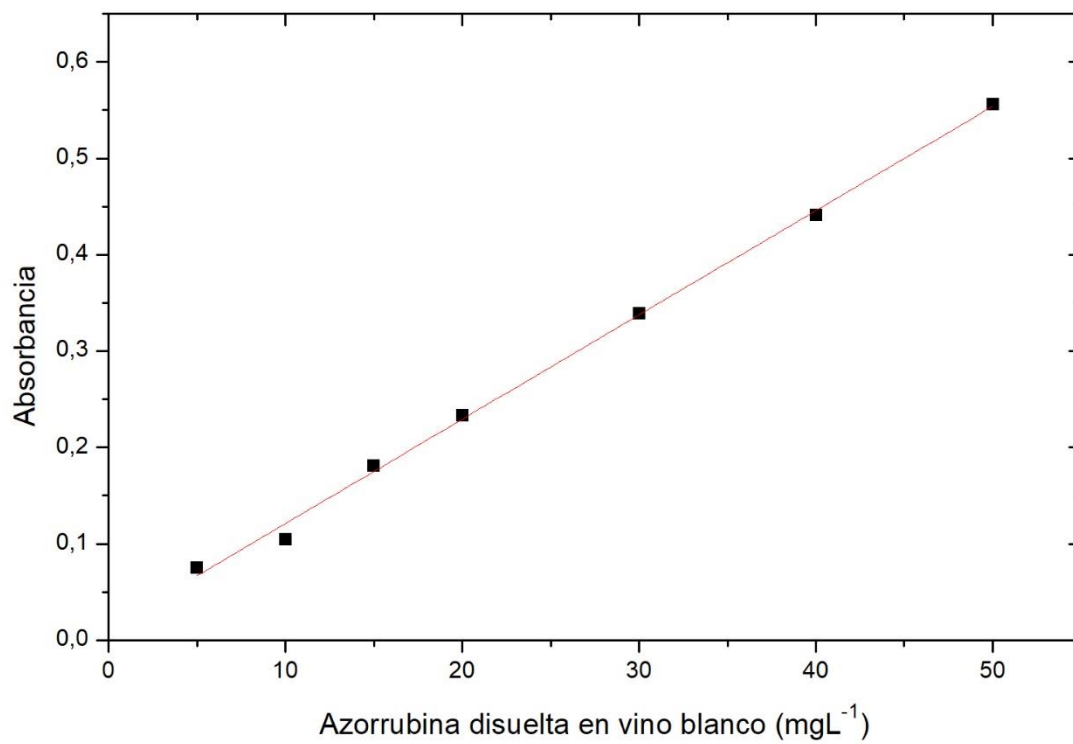


Figura 17: Ajuste lineal de concentración de azorrubina disuelta en vino blanco (mgL⁻¹) versus absorbancia a 520 nm.

Tabla 6: Datos de cromatografía de muestra T2.

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.271	BB	0.1820	258.44318	21.84535	0.4768
2	8.786	VV	0.2221	90.51374	6.43418	0.1670
3	9.168	VV	0.1827	154.26118	12.43623	0.2846
4	9.547	VB	0.1489	3000.89136	304.76068	5.5362
5	10.036	BB	0.1247	20.05408	2.69947	0.0370
6	10.300	BV	0.1452	42.13705	4.42047	0.0777
7	10.810	VV	0.1794	668.96814	53.65900	1.2341
8	11.672	VB	0.1741	3966.01807	335.12695	7.3167
9	12.506	BV	0.1684	77.59623	7.04787	0.1432
10	12.726	VV	0.1537	77.96154	7.47127	0.1438
11	13.203	VB	0.2065	4637.88867	345.79333	8.5562
12	14.194	BB	0.2878	2.96304e4	1558.82849	54.6637
13	15.526	BV	0.2487	62.96805	3.93450	0.1162
14	16.216	VB	0.3261	602.41168	28.56062	1.1114
15	17.248	BB	0.3155	611.94208	30.05975	1.1289
16	19.668	BB	0.4557	146.87357	4.81676	0.2710
17	20.947	BB	0.5879	381.82736	9.16766	0.7044
18	25.390	BB	0.3394	129.68083	5.74284	0.2392
19	29.763	BV	0.2735	1121.81091	59.61673	2.0696
20	30.279	VV	0.2168	173.02034	11.81909	0.3192
21	30.856	VB	0.2416	5895.57129	374.60886	10.8765
22	32.712	VV	0.2153	58.97379	4.16137	0.1088
23	33.111	VB	0.2038	54.71964	4.20425	0.1009
24	33.847	BV	0.2898	187.34860	9.03832	0.3456
25	36.295	BV	0.2170	313.59415	22.44171	0.5785
26	37.026	VV	0.2330	1621.06055	106.87527	2.9906
27	37.589	VB	0.2452	44.62479	2.75199	0.0823
28	39.938	BB	0.2281	134.33514	8.90033	0.2478
29	42.335	BB	0.2177	38.92717	2.70789	0.0718
Totals :				5.42048e4	3349.93124	

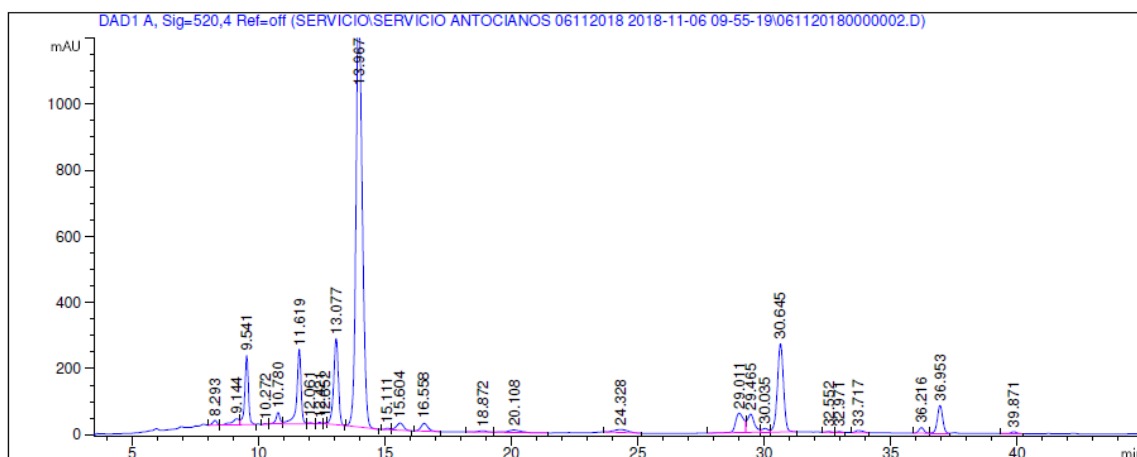
**Figura 18:** Cromatograma de perfil de antocianos de muestra C2.

Tabla 7: Datos de cromatografía de muestra C2.

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.271	BB	0.1820	258.44318	21.84535	0.4768
2	8.786	VV	0.2221	90.51374	6.43418	0.1670
3	9.168	VV	0.1827	154.26118	12.43623	0.2846
4	9.547	VB	0.1489	3000.89136	304.76068	5.5362
5	10.036	BB	0.1247	20.05408	2.69947	0.0370
6	10.300	BV	0.1452	42.13705	4.42047	0.0777
7	10.810	VV	0.1794	668.96814	53.65900	1.2341
8	11.672	VB	0.1741	3966.01807	335.12695	7.3167
9	12.506	BV	0.1684	77.59623	7.04787	0.1432
10	12.726	VV	0.1537	77.96154	7.47127	0.1438
11	13.203	VB	0.2065	4637.88867	345.79333	8.5562
12	14.194	BB	0.2878	2.96304e4	1558.82849	54.6637
13	15.526	BV	0.2487	62.96805	3.93450	0.1162
14	16.216	VB	0.3261	602.41168	28.56062	1.1114
15	17.248	BB	0.3155	611.94208	30.05975	1.1289
16	19.668	BB	0.4557	146.87357	4.81676	0.2710
17	20.947	BB	0.5879	381.82736	9.16766	0.7044
18	25.390	BB	0.3394	129.68083	5.74284	0.2392
19	29.763	BV	0.2735	1121.81091	59.61673	2.0696
20	30.279	VV	0.2168	173.02034	11.81909	0.3192
21	30.856	VB	0.2416	5895.57129	374.60886	10.8765
22	32.712	VV	0.2153	58.97379	4.16137	0.1088
23	33.111	VB	0.2038	54.71964	4.20425	0.1009
24	33.847	BV	0.2898	187.34860	9.03832	0.3456
25	36.295	BV	0.2170	313.59415	22.44171	0.5785
26	37.026	VV	0.2330	1621.06055	106.87527	2.9906
27	37.589	VB	0.2452	44.62479	2.75199	0.0823
28	39.938	BB	0.2281	134.33514	8.90033	0.2478
29	42.335	BB	0.2177	38.92717	2.70789	0.0718
Totals :				5.42048e4	3349.93124	