

## **PRÁCTICA N° 8.- ANÁLISIS DE MADURACIÓN.**

### **A) FUNDAMENTOS:**

El desarrollo de la baya supone un aumento del volumen, acompañado de cambios en las características físicas y la composición química, distinguiéndose tres fases en su desarrollo: periodo herbáceo, maduración y sobremaduración.

En la maduración, el contenido de azúcares de la baya aumenta procedente de las hojas maduras y de las zonas de reserva, y de las transformaciones del ácido málico presente en la baya. La acidez disminuye por un aumento en el volumen de agua, por combustión respiratoria del málico y transformación de este en azúcares, mientras que el tartárico permanece casi constante.

Así mismo se produce un aumento en la concentración de fenoles en el hollejo, pulpa, pepitas y raspón, que influye en las características organolépticas y en la coloración varietal de las uvas.

La concentración de cada uno de los componentes en un tejido es el resultado de tres procesos:

- transporte dentro o fuera del tejido
- síntesis y degradación del compuesto
- cambio relativo en el volumen de solvente, agua

El crecimiento de la baya se debe tanto a un incremento en el número de células (que se eleva de 3 a 4 veces en el transcurso de su desarrollo) como al aumento del tamaño de esas células (el volumen celular puede alcanzar aproximadamente unas 300 veces su valor inicial).

La curva característica de crecimiento de la baya es una doble sigmoide en la que se diferencian tres fases: fase I de rápido crecimiento, fase II de crecimiento ralentizado o nulo y fase III de crecimiento rápido y maduración.

El crecimiento de la fase III es debido a la expansión de las células (aumenta su turgor y la elasticidad de sus paredes celulares). Gran parte del aumento del peso se debe al aumento en la cantidad de agua. Dicha cantidad depende del balance de agua en el interior de la baya, donde en esta fase III es el resultado: agua que entra en la savia elaborada vía floema (muy poco ya vía xilema debido a su bloqueo en envero), y algo a través de la absorción general a través de los tejidos dérmicos; menos la cantidad que se pierde por transpiración (entre floración y vendimia la baya transpira 10 veces el volumen de agua almacenada en la uva madura).

Los resultados analíticos relativos a los diferentes componentes de la baya pueden expresarse de dos maneras: referidos al litro del mosto (g/L) o a un número determinado de bayas (g/100 bayas). Estos no tienen el mismo significado y el uso de ambos es complementario y muy útil. Las bayas aumentan de volumen en el transcurso de la maduración, de tal forma que 1 litro de mosto no se obtiene del mismo número de bayas. Al expresar los componentes en g/L los valores están influidos por alteraciones

accidentales en el peso de la baya como las lluvias (que en ciertos momentos del ciclo de la baya provoca aumentos de peso y por lo tanto efectos de dilución) o el aumento de las temperaturas (que provoca una transpiración que supone una pérdida de peso y por tanto un efecto de concentración de los componentes presentes). Esta expresión es interesante a su vez desde el punto de vista enológico pues es una medida de lo que se va a encontrar posteriormente en bodega y de las concentraciones de los diferentes componentes que pasan al mosto. Al tomar la expresión en g/100 bayas, los efectos anteriores no afectan a los datos analíticos, ya que la cantidad absoluta es independiente de las modificaciones accidentales que sufra la baya. Sin embargo, dicha expresión es interesante porque nos informa de lo que sucede en la baya sin tener en cuenta su volumen (la bioquímica del fruto). Esto nos da una información muy útil desde el punto de vista vitícola, ya que conociendo lo que sucede en la baya podremos dar soluciones en campo ante problemáticas que se presenten. Las cifras de ambas expresiones se diferencian según el efecto de dilución que va siendo mayor a medida que se produce el crecimiento de las bayas.

### **a.1.) AZÚCARES:**

Principales azúcares: Glucosa y Fructosa (llegan a representar el 99% de los hidratos de carbono del mosto, y entre el 12-27% del peso de la baya madura).

- Acumulación (principalmente en pulpa): traslocación desde hojas (floema, fotosíntesis), estructura (floema, reservas), síntesis en la baya (verde, fotosíntesis).

Su determinación es importante para la determinación del momento óptimo de vendimia. Se usa el °Brix como indicador del contenido en azúcares, y la escala expresa los sólidos solubles totales (azúcares y resto de sustancias disueltas) como una cantidad por unidad de solvente (agua). Así el °Brix viene expresado como gramos de sacarosa en 100 gramos de solución. Así por ejemplo, una solución de 25 °Brix tiene 25 gramos de azúcar (sacarosa) por 100 gramos de líquido o, dicho de otro modo, hay 25 gramos de sacarosa y 75 gramos de agua en los 100 gramos de la solución.

Los °Brix se miden con un refractómetro. Los resultados varían con la temperatura de manera que existen refractómetros que corrigen el valor a uno bajo una temperatura normalizada (20°C). Si no es así, se debe aplicar un factor de corrección en función de la temperatura.

### **a.2.) ÁCIDOS ORGÁNICOS:**

Principales ácidos orgánicos: Tartárico y Málico (suponen generalmente un 90% o más de la acidez de las uvas), y el cítrico pero en mucha menor medida.

- 6-12 g/L en TH<sub>2</sub>

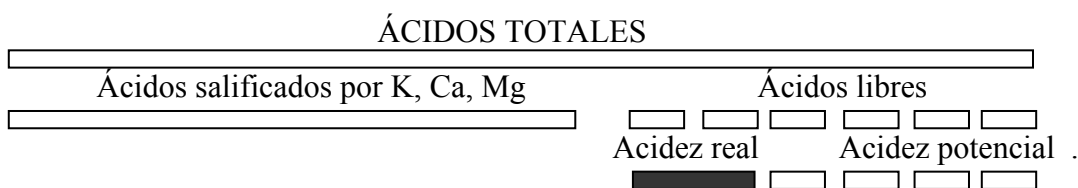
- Más de la mitad de la acidez es por TH<sub>2</sub>

Son productos de la fotosíntesis de hojas y bayas: al inicio se acumulan y posteriormente, al avanzar la maduración, disminuyen: sales, respiración, dilución (no hay a penas síntesis), menos traslocación, no fotosintetizan las bayas.

La acidez es debida a la presencia de H<sup>+</sup> liberados por los ácidos. Se estima que un molécula de ácido tartárico libera 1H<sup>+</sup>, el málico libera 1/3 H<sup>+</sup>, y el láctico de 1/6 a 1/7 H<sup>+</sup>. Por lo tanto el TH<sub>2</sub> es el ácido más fuerte.

Estos ácidos se encuentran parcial o totalmente ionizados, que son neutralizadas parcialmente por cationes ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{K}^{+}$ ). El catión principal de la baya es el  $\text{K}^{+}$ , ya que, de los tres cationes nombrados antes, es el más abundante en la uva (casi el 50% de toda la fracción mineral). Los ácidos totalmente neutralizados no van a participar en el valor y sensación de la acidez.

La expresión de la acidez puede venir como pH y acidez de valoración. El **pH** indica el porcentaje de protones libres y se mide con un pH-metro. La **acidez de valoración o total** corresponde a la suma de la acidez real (que es pequeña y que indica los protones presentes procedentes de los ácidos ionizados) y la acidez potencial (que representa los protones ionizables). La acidez y el pH están relacionados de manera que cuando la acidez es alta, el pH es bajo y viceversa. El pH indica la acidez real.



De todo ello se infiere que la acidez real, y por lo tanto el pH, depende de la neutralización del ácido tartárico por el potasio.

Para la determinación se realiza una volumetría ácido-base en la que se neutraliza los grupos carboxílicos de la muestra al añadir un alcali de concentración conocida. Se considera que todos los ácidos están neutralizados cuando se alcanza un pH de 8.2 a 20°C. Para ello, sobre un volumen de mosto centrifugado y homogeneizado se añade hidróxido sódico (NaOH) 0.1N de factor conocido, y con la ayuda de un pH-metro y su electrodo de vidrio introducido en el volumen de mosto elegido se ve el fin de la neutralización.

Para hallar el valor de la acidez se emplea la siguiente fórmula:

$$\text{g ácido tartárico /L} = (\text{V Na OH} \cdot 150 \cdot 0.1) / (\text{V mosto} \cdot 2)$$

Siendo:        V NaOH : volumen gastado en la valoración para alcanzar pH 8.2 (ml)  
                   Vmosto: volumen de mosto pipeteado.

### a.3.) POTASIO

El  $\text{K}^{+}$  se encuentra tanto en pulpa como en hollejo, y es el catión más abundante (2875 ppm frente a 200 ppm de Ca)

Procede de la migración desde hojas y tallos principalmente, y de la absorción radicular. Aunque también llega a través del xilema, lo hace principalmente via floema.

Su incremento depende del equilibrio entre su velocidad de acumulación en la baya y la velocidad de crecimiento de la baya. Su pérdida se produce si hay retorno xilemático de la baya a la cepa, pero entonces sólo se da hasta el envero.

La baya es un fuerte sumidero  $\text{K}^{+}$  entre envero y vendimia (se puede localizar en la baya hasta 60% del  $\text{K}^{+}$  que hay en la parte aérea)

Para el análisis de estos componentes se debe recoger en campo muestras de 100 bayas de cada parcela diferenciada, con periodicidad semanal a partir de enero a fin de determinar la fecha óptima de vendimia. Tras pesar las bayas, se extrae el mosto con un pasapurés. El mosto obtenido se vierte en una probeta para medir su rendimiento en mosto, y de ahí a unos tubos de centrifuga donde se centrifugan durante 3 minutos a 3200 r.p.m. Una vez centrifugado, se recoge el sobrenadante en una probeta para realizar las determinaciones analíticas.

#### **a.4.) COMPUESTOS FENÓLICOS:**

Compuestos fenólicos: Antocianos (50% de los compuestos fenólicos, en hollejos principalmente y después del enero) y Taninos (Tintas: 50% en hollejos, Blancas:75% en semillas. Antes del enero).

Mediante el método de Glories se determina el contenido de antocianos extraíbles y totales en las uvas, y el contenido de polifenoles totales de las mismas.

En el laboratorio las bayas se trituran por separado en una batidora durante 2 minutos.

Con una pequeña muestra de ese triturado se analiza el grado Brix de la muestra para hallar su densidad. Con esa densidad se calculan los gramos de triturado (Masa) que corresponden a 50 ml de triturado:

$$\begin{aligned} \text{Masa} &= \text{Densidad (g/dm}^3\text{)} * \text{Volumen (L)} \\ \text{Masa} &= \text{Densidad} * 0,05 \end{aligned}$$

Para cada muestra serán necesarios dos vasos de precipitado de 250 ml en los que se añadirá a cada uno los gramos de triturado obtenidos en el cálculo anterior: uno para TH<sub>2</sub> y el otro para HCl.

En el vaso para TH<sub>2</sub> se adicionan 50 ml de una solución de Ácido tartárico de pH= 3,2, y en el vaso para HCl se adicionan 50 ml de una solución de Ácido Clorhídrico de pH= 1. Los vasos se agitan para mezclar la solución con el triturado y se dejan macerar en reposo durante 4 horas.

Pasadas las 4 horas de maceración se separan las partes sólidas de las líquidas mediante el empleo de probetas, embudos y lana de vidrio. Se dejará que la lana de vidrio ejerza de colador y una vez separada la parte líquida se conservará para realizar sobre ella los análisis.

##### **a.4.1.) MEDIDA DE POLIFENOLES TOTALES (IPT)**

La medida en el espectrofotómetro de la absorción a 280 nm corresponde a la totalidad de los compuestos fenólicos. Representa la suma de la contribución fenólica de los antocianos de los hollejos y de los taninos de los hollejos.

Para realizar esta medida se emplea la parte líquida obtenida del vaso de macerado al que se adicionó tartárico (pH= 3,2). Se realizará sobre el mismo una dilución 1/40, es decir, en un vaso de precipitado se adiciona 1 ml de muestra de pH 3,2 y se añaden 39 ml de agua destilada.

La dilución se lleva a una cubeta de cuarzo de 10 mm y se realiza la lectura en un espectrofotómetro de la absorbancia a 280 nm. El blanco se hace con agua destilada.

$$\begin{aligned} \text{IPT} &= \text{A} * \text{Dilución} \\ \text{A} &= \text{absorbancia a 280 nm} \end{aligned}$$

Se han realizado dos diluciones: 1/2 al adicionar 50 ml de Tartárico y 1/40 con agua destilada.

El Índice de Polifenoles Totales se obtiene finalmente de la fórmula:

$$IPT = A * 40 * 2$$

#### **a.4.2.) MEDIDA DEL CONTENIDO DE ANTOCIANOS**

(Determinación por el método de decoloración con SO<sub>2</sub> establecido por Ribereau-Gayon y Stonestreet)

Las probetas con el macerado en el que se adicionó Tartárico pH 3,2 darán lugar a los valores finales de antocianos extraíbles, mientras que las de macerado con HCl pH 1 dan lugar a los resultados de antocianos totales.

Inicialmente se realizarán los análisis en las probetas con tartárico y después en las probetas de clorhídrico. En ambos casos se procederá de igual forma:

Se prepara primero una solución base:

- Tomar 1 ml de la probeta y echarlo en un vaso de precipitado de 100 ml.
- Añadir 1 ml de la solución de etanol 0,1% de HCl al vaso
- Añadir 20 ml de HCl 2% al vaso.

De la solución base elaborada en el vaso de precipitado se pipetea 10 ml y se añaden a un vaso de plástico identificado con el n° de muestra (vaso A). Se vuelven a pipetear otros 10 ml de la solución base y se adicionan a otro vaso de plástico también identificado (vaso B).

Adicionar en el “vaso A” 4 ml de agua destilada. Adicionar en el “vaso B” 4 ml de bisulfito de sodio (la solución se decolora instantáneamente). Pasados 20 minutos se realizarán las medidas de absorbancia en el espectrofotómetro a 520 nm. Las medidas se realizarán en cubetas de plástico de 1 cm de paso y se harán comprobaciones de blanco con agua destilada cada 8 muestras analizadas.

Tras realizar las lecturas de absorbancia, se realiza el cálculo de resultados:

$$\text{Antocianos extraíbles (mg/l)} = (A_{\text{agua destilada TH2}} - A_{\text{bisulfito sódico TH2}}) * 2 * 875$$

$$\text{Antocianos totales (mg/l)} = (A_{\text{agua destilada HCl}} - A_{\text{bisulfito sódico HCl}}) * 2 * 875$$

El valor 875 es el coeficiente de extinción de la malvidina.

A = medida de absorbancia.

#### **a.4.3.) MEDIDA DEL ÍNDICE DE MADUREZ CELULAR (IMC)**

Con las lecturas realizadas en el espectrofotómetro puede determinarse el índice de madurez celular. Cuanto más bajo sea el IMC, los antocianos son más fácilmente extraíbles y cuanto más elevado, los antocianos son menos susceptibles de pasar al vino en la vinificación.

$$IMC = (\Delta A_{\text{HCl}} - \Delta A_{\text{TH2}}) * 100 / \Delta A_{\text{HCl}}$$

Siendo:

$$\Delta A_{\text{HCl}} = A_{\text{agua destilada HCl}} - A_{\text{bisulfito sódico HCl}}$$

$$\Delta A_{\text{TH2}} = A_{\text{agua destilada TH2}} - A_{\text{bisulfito sódico TH2}}$$

**B) ACTIVIDADES:**

Determinar:

1. Partes del racimo y su porcentaje: raspón y baya.
2. Partes de la baya y su porcentaje: hollejo, pulpa y semillas.
3. Peso de 100 bayas y su rendimiento en mosto.
4. Composición del mosto: °Brix, pH y acidez titulable
5. Composición fenólica

**Nota:** a continuación se facilita un ejemplo de estadillo para que sirva de orientación, en todo caso está incompleto ya que falta trazabilidad y unidades.

MUESTRA	Nº bayas	Peso bayas	Peso raspón	Peso hollejos	Peso semillas	
	Volumen del mosto	°Brix	pH	Acidez titulable		
				Vol mosto	Vol NaOH	Acidez en TH2
	da	MASA 50ml	HCl pH1	TH2 pH 3,2		K+
			D520	D520	D280	