



ABER DE MIS HIJOS  
LA MI GRANDEZA

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos

Programa de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos

**Especialidad en Almacenamiento y Procesamiento de Granos**

**Estudio de la Generación de Acetaldehído y Presencia de  
Carbamato de Etilo Durante el Proceso de Elaboración del Vino  
de Uva (*Vitis vinifera*) Carignane de Sonora.**

**TESIS**

Que para obtener el Grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

Presenta:

***I.Q. María Esther Parra Durazo***

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## CONTENIDO

|   | Página |
|---|--------|
| ÍNDICE DE TABLAS.....   | ix     |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....   | x      |
| RESUMEN.....  | xii    |
| INTRODUCCIÓN.....   | 1      |
| OBJETIVOS.....  | 3      |
| ANTECEDENTES.....   | 4      |
| Relevancia de la Fermentación Alcohólica del Vino.....  | 4      |
| Levaduras Alcohólicas en la Fermentación Alcohólica.....  | 4      |
| Alcoholes en la Fermentación Alcohólica.....  | 6      |
| Uso de Compuestos de Nitrógeno y Aminoácidos.....   | 8      |
| Características de la Fermentación en el Mosto de Uva.....                                      | 9      |
| La Uva.....   | 9      |
| Industria Vinícola en Sonora.....   | 10     |
| El Vino.....  | 13     |
| Compuestos Nitrogenados .....   | 13     |
| Bondades del Vino.....  | 16     |
| Toxicidad de Bebidas Alcohólicas.....   | 18     |
| Toxicidad del Vino.....   | 18     |
| Metabolitos no Alcohólicos.....   | 19     |
| Carbamato de etilo.....   | 19     |
| Formación del Carbamato de Etilo.....   | 19     |
| Toxicidad del Carbamato de etilo.....   | 22     |
| Papel de la Temperatura de Fermentación en la Producción<br>de Carbamato de etilo.....          | 23     |
| Legislaciones para CE.....  | 23     |
| Acetaldehído.....   | 24     |
| Formación del Acetaldehído.....   | 25     |
| Toxicidad del Acetaldehído.....   | 25     |
| Formación del Acetaldehído durante la Fermentación con<br><i>Saccharomices cerevisiae</i> ..... | 26     |
| Papel de la Temperatura de Fermentación en la   |        |

|  |    |
|--|----|
| Producción del Acetaldehído.....   | 27 |
| Otros Factores de la Fermentación en la Producción de Acetaldehído.....  | 27 |
| Papel de la Temperatura y la Inmovilización de la Enzima Deshidrogenasa en la Fermentación para la Producción de Acetaldehído.....   | 28 |
| Legislaciones para Acetaldehído.....   | 28 |
| METODOLOGÍA.....   | 32 |
| Materia Prima.....   | 32 |
| Preparación de las Muestras de Vino.....   | 32 |
| Diseño de Fermentadores Experimentales.....  | 33 |
| Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....  | 33 |
| Determinación del Grado Brix (°Bx).....  | 36 |
| Determinación del Porcentaje Alcohol-Volumen.....  | 36 |
| Determinación del Acetaldehído.....  | 38 |
| Determinación del Carbamato de etilo.....  | 39 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....  | 40 |
| Variación del °Bx Durante el Proceso de Fermentación.....  | 40 |
| Producción de Alcohol Durante el Proceso de Fermentación.....  | 42 |
| Rendimiento de la Producción de Etanol.....  | 43 |
| Acetaldehído.....  | 45 |
| Efecto de la Temperatura de Fermentación y la Concentración de enzima Pécica sobre la Producción del Acetaldehído durante la Fermentación del Mosto de Uva Carignane ..... | 45 |
| Carbamato de etilo.....  | 53 |
| Validación del Método.....   | 53 |
| Presencia del Carbamato de etilo durante el Proceso de Fermentación.....   | 57 |
| Presencia del Carbamato de etilo en Muestras Adicionadas con Urea.....   | 61 |
| CONCLUSIONES.....  | 63 |
| RECOMENDACIONES.....   | 65 |
| REFERENCIAS.....   | 66 |

## INDICE DE TABLAS

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| Tabla 1. Alcoholes más importantes presentes en vinos.....   | 7             |
| Tabla 2. Principales entidades que participan en la producción de uva en México.....   | 11            |
| Tabla 3. Composición química promedio del vino tinto de mesa.....  | 15            |
| Tabla 4. Aminoácidos en mostos y vinos.....  | 17            |
| Tabla 5. Concentraciones de acetaldehído encontradas en vinos.....   | 30            |
| Tabla 6. Niveles de acetaldehído en bebidas alcohólicas.....   | 31            |
| Tabla 7. Cuadro del Diseño Experimental que indica las temperaturas, concentraciones de enzima y tiempos utilizados en el estudio..... | 35            |
| Tabla 8. Efecto de la temperatura y la concentración de enzima péctica en la producción de etanol por °Bx.....                         | 46            |
| Tabla 9. Concentración de Acetaldehído determinado a cada una de las temperaturas con cada concentración de enzima péctica.....        | 54            |

## INDICE DE FIGURAS

|  | Página |
|--|--------|
| Figura 1. Esquema de la glicólisis y de la fermentación alcohólica.....  | 5      |
| Figura 2. Diagrama de flujo para la elaboración del vino.....  | 14     |
| Figura 3. Degradación de la arginina.....  | 21     |
| Figura 4. Diseño y dimensiones de los fermentadores experimentales...  | 34     |
| Figura 5. Diagrama que muestra las operaciones para la preparación de la muestra de uva Carignane durante el proceso de fermentación. ....   | 37     |
| Figura 6. Efecto de la temperatura y el tiempo sobre la cantidad de azúcares (expresado en °Bx) durante el proceso de fermentación de mosto de uva Carignane.....                              | 41     |
| Figura 7. Efecto de la temperatura y el tiempo de fermentación en el contenido de etanol (% Alc. Vol.) durante el proceso de fermentación de mosto de uva Carignane .....                      | 44     |
| Figura 8. Efecto de cada una de las temperaturas y las concentraciones de enzima péctica sobre la producción de acetaldehído durante el proceso de fermentación de mosto de uva Carignane..... | 47     |
| Figura 9. Efecto la temperatura 20°C y la concentración de enzima péctica sobre la producción de acetaldehído durante el proceso de fermentación de mosto de uva Carignane.....                | 49     |
| Figura 10. Efecto la temperatura 30°C y la concentración de enzima péctica sobre la producción de acetaldehído durante el proceso de fermentación de mosto de uva Carignane.....               | 51     |
| Figura 11. Efecto la temperatura 35°C y la concentración de enzima péctica sobre la producción de acetaldehído durante el proceso de fermentación de mosto de uva Carignane.....               | 52     |
| Figura 12. Curva de calibración para la técnica de determinación de etil   |        |

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| carbamato.....  | 55            |
| Figura 13. Tiempo de retención en estándares del carbamato de etilo en cromatografía de líquidos.....   | 57            |
| Figura 14. Cromatograma aumentado de tamaño para resaltar el pico de carbamato de etilo en estándares utilizados en cromatografía líquida.....      | 58            |
| Figura 15. Cromatograma que indica el tiempo de retención para carbamato de etilo para muestras tomadas durante el proceso de fermentación.....     | 59            |
| Figura 16. Cromatograma que indica que no hay presencia de pico para carbamato de etilo en muestras tomadas durante el proceso de fermentación..... | 60            |
| Figura 17. Cromatograma que indica que no hay presencia de carbamato de etilo en muestras fermentadas con urea.....                                 | 62            |

## INTRODUCCIÓN

El vino es el producto final de la fermentación alcohólica total o parcial del jugo de uvas frescas (Prescott y Dunn, 1982) y se clasifica en general en tres tipos: vinos rojos, blancos y rosados los cuáles se diferencian unos de otros por la variedad de la uva de la que provienen y el tipo de procesamiento que reciben (Vine, 2002).

Estudios realizados por algunos investigadores demuestran que el vino presenta algunos compuestos de toxicidad significativa, entre ellos se encuentran acetaldehído y carbamato de etilo.

Maarse y Vischer (1989) (citado por Ferreira y Cols., 2004) reportaron que el aldehído principal de los vinos es el acetaldehído. Éste compuesto se forma durante la fermentación alcohólica a partir de glucosa (Delfini y Formica, 2001). Si el compuesto se presenta en gran cantidad influye negativamente en una disminución del etanol y de la acidez total, produciendo esto último, el efecto que se conoce como “ahilado” del vino (Mesa y Cols., 1999). En estudios realizados por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) se encontraron casos de tumoraciones bronquiales y en la cavidad oral en personas que fueron expuestas a aldehídos (IARC, 1999).

Otro compuesto tóxico que se determinó en este estudio es el carbamato de etilo también llamado uretano (Winter, 2002), el cual es un compuesto natural que se presenta en los alimentos y bebidas fermentadas (Butzke y Bisson, 1997) donde la actividad microbiológica ha sido una parte integral del proceso de producción; Pereira y Cols. (1991), Zimmerli y Schlatter (1991), Allen y Cols. (1986) y Mirvish (1968) (citados por Woo y Cols., 2001) indican que es un compuesto cancerígeno en ratas y ratones de laboratorio. Este compuesto ha mostrado su potencial cancerígeno en estudios con animales y se ha clasificado dentro del grupo 2 de la IARC (IARC, 1974).



En el presente estudio y con el fin de determinar el comportamiento cinético del acetaldehído y la presencia de carbamato de etilo, se llevó a cabo la fermentación del jugo de uva Carigñane de la costa de Hermosillo en donde se encontró que acetaldehído si se presentó en todas las muestras analizadas, sin embargo para carbamato de etilo no hubo presencia del compuesto es ninguna de las muestras analizadas durante el proceso de fermentación.

# OBJETIVOS

## Objetivo General

Evaluar el comportamiento cinético de la generación de acetaldehído y la presencia de carbamato de etilo en el proceso de elaboración de vinos de uva Carigñane a nivel laboratorio, utilizando la uva que se produce en Sonora.

## Objetivos Específicos

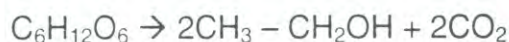
1. Definir el comportamiento de la fermentación del mosto de uva Carigñane en lo concerniente a etanol y azúcares fermentables.
2. Determinar el efecto de las variables temperatura y concentración de enzimas del proceso de fermentación sobre la concentración de acetaldehído y carbamato de etilo en el producto terminado.
3. Determinar las concentraciones de acetaldehído y carbamato de etilo en diferentes condiciones de fermentación.

## ANTECEDENTES

### Relevancia de la Fermentación Alcohólica del Vino

La transformación del mosto en vino se produce por un fenómeno biológico que todos los vinicultores conocen con el nombre de fermentación alcohólica (De la Llana, 1980).

El término fermentación alcohólica se refiere a la transformación bioquímica de la glucosa y la fructosa a etanol y dióxido de carbono de acuerdo a la reacción propuesta por Gay-Lussac (Delfini y Formica, 2001). El nombre proviene de *fervere*, que quiere decir hervir (Oreglia, 1978).



La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es el microorganismo más proliferante que lleva a cabo la fermentación alcohólica; inicia la degradación de los azúcares a ácido pirúvico via glicólisis utilizando la biosíntesis de Embden-Meyerhof (Fig. 1). Subsecuentemente, el ácido pirúvico es descarboxilado a acetaldehído seguido por la reducción a etanol en presencia de alcohol deshidrogenasa y NADH<sub>2</sub>; la glicólisis y la fermentación alcohólica contribuyen directa e indirectamente en la formación de numerosos metabolitos. Muchos de ellos son producidos en pequeñas cantidades en comparación con el etanol y el dióxido de carbono, y éstos son llamados "Metabolitos secundarios". La producción directa resulta en los metabolitos secundarios: glicerol, ácido pirúvico y acetaldehído (Delfini y Formica, 2001).

### **Levaduras Alcohólicas en la Fermentación Alcohólica**

De la Llana (1980) reporta que la calidad de un vino depende, hasta cierta medida, de la naturaleza y la calidad de la materia prima

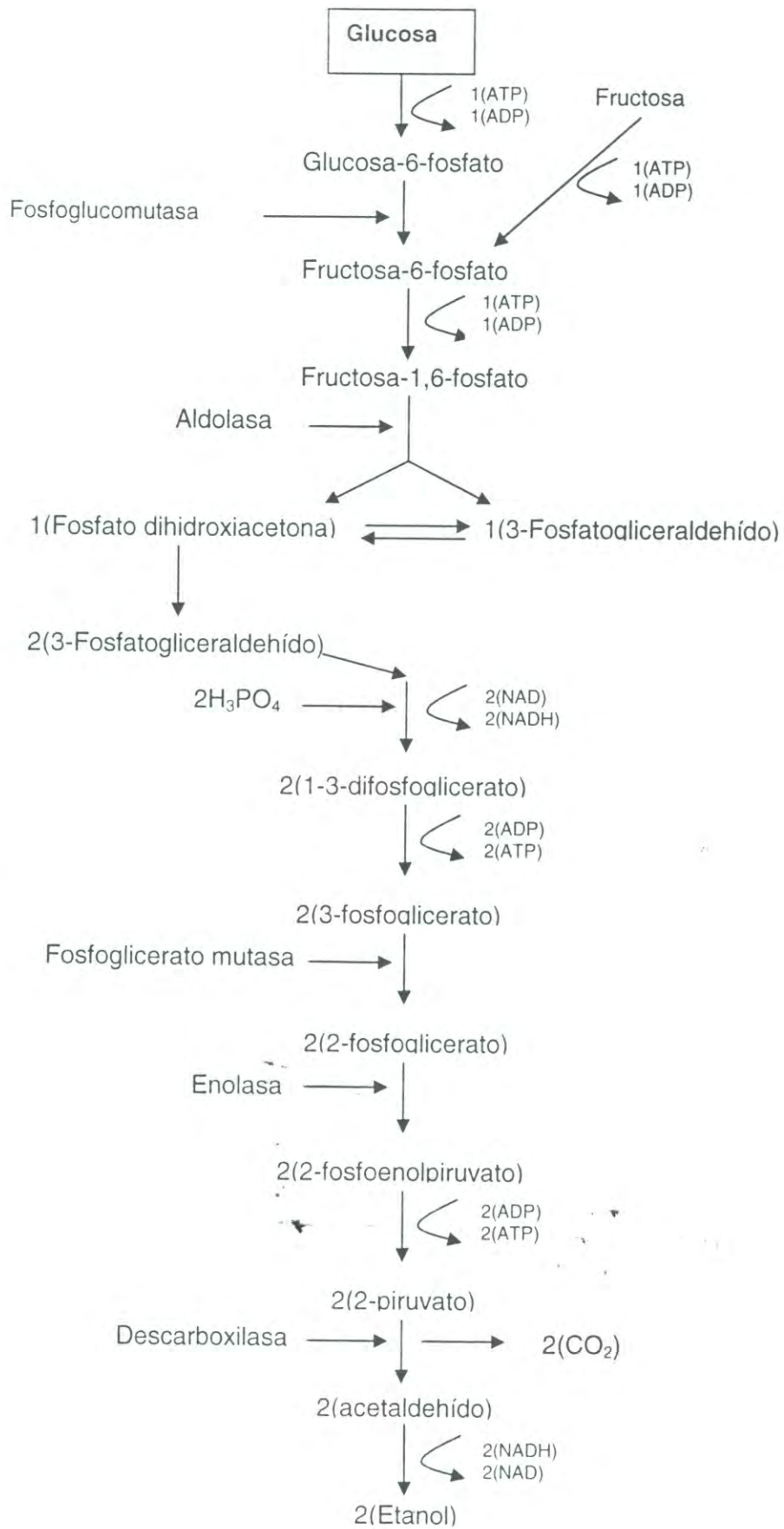


Figura 1. Esquema de la glicólisis y de la fermentación alcohólica.

Fuente: Delfini y Formica (2001).

puesta en juego, depende mucho también de la naturaleza, actividad y pureza del fermento alcohólico. Pasteur, mediante sus notables trabajos sobre las fermentaciones demostró, en particular, que la transformación del mosto de uva en vino estaba ligada a la existencia en el medio de un gran número de seres vivientes microscópicos; las levaduras, seres vivos unicelulares, extremadamente pequeños (de un diámetro comprendido entre 4 y 10 micras), clasificados en el reino vegetal; tienen diversas formas según las especies: redondas, ovaladas, elípticas y a veces muy alargadas; están constituidas por una membrana muy fina en cuyo interior se encuentra un núcleo rodeado de hialina, una materia gelatinosa semifluida, cuando la célula es joven y granulosa, pero cuando es de mayor edad es llamada protoplasma (De la Llana, 1980).

Las levaduras de interés para la elaboración del vino pertenecen a un pequeño grupo dentro del género *Saccharomices*. Únicamente algunas especies de este género son las que actúan en la fermentación del mosto; la *Saccharomices cerevisiae* es la más común, siendo las dos variedades más frecuentemente la *S. cerevisiae cerevisiae* y la *S. cerevisiae bayanus* (Ough, 1992).

### **Alcoholes en la Fermentación Alcohólica**

El etanol es el producto más relevante de la fermentación mediante levaduras de hidrato de carbono naturales; ha sido estudiado en detalle por su proporción y simplicidad de formación, así como por la estabilidad biológica de los vinos secos y sus agradables efectos fisiológicos; los vinos contienen, junto al etanol, un cierto número de otros mono y polialcoholes, los cuales se detallan en la Tabla 1 (Amerine y Ough, 1976). En esta observamos como dentro de los monoalcoholes se presenta el metanol, el cual es un líquido incoloro a temperatura ambiente con un olor suave (Cabaroglu, 2005 citado por López, 2006), es un compuesto tóxico y ésta toxicidad se debe a la propiedad que tienen sus metabolitos de precipitar proteínas de las vías nerviosas; estos compuestos son el

Tabla 1. Alcoholes más importantes presentes en los vinos.

| Monoalcoholes  | Polialcoholes   |
|--|---|
| Metanol  | Glicerina   |
| 1-propanol   | 2-3-butanodiol ( <i>levo</i> )                                    |
| 1-butanol  | 2,3-butanodiol ( <i>meso</i> )                                    |
| 2-metil-1-propanol (alcohol isobutílico)                   | 1,2,3,4,5,6-exanoexol ( <i>levo</i> ) (D-sorbita)                 |
| 2-metil-1-butanol ( <i>levo</i> ) (alcohol amílico activo) | 1,2,3,4,5,6-cicloexanoexol ( <i>meso</i> ) ( <i>meso</i> inosita) |
| 3-metil-1-butanol (alcohol isoamílico)                     |   |
| 1-hexanol  |   |
| 2-fenil-etanol ( $\beta$ -fenetilalcohol)                  |   |

Fuente: Amerine y Ough, 1976.

ácido fórmico y el formaldehído y el daño que causan en el organismo es irreparable (Sánchez, 2002). También observamos que se encuentra presente la glicerina y el 2,3 butanodiol como polialcoholes.

Los alcoholes de mayor peso molecular son los responsables de parte de los complejos atributos sensoriales del vino, nos ayudan a conocer la pureza del material del que procede el vino o a decidir sobre la posibilidad de su adulteración. Los monoalcoholes contenidos en los vinos son, sin excepción, líquidos incoloros; su movilidad varía desde los que fluyen con gran libertad, como el metanol, hasta los muy viscosos, también varían sus olores: el metanol es casi inodoro, el 1-propanol tiene un olor dulzón agradable, el *n*-butanol posee un olor duro y penetrante y el 2-fenil etanol exhala un aroma muy pegajoso parecido al de la rosa; los polialcoholes son más viscosos y tienen poco o ningún olor, y los azúcares polialcoholes con 6 átomos de carbono son sólidos a la temperatura ambiente (Amerine y Ough, 1976).

### **Uso de Compuestos de Nitrógeno y Aminoácidos**

Las levaduras del vino utilizan nitrógeno en forma de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), urea, aminoácidos y péptidos. La urea no existe en mostos, pero puede ser producida en pequeñas cantidades por las levaduras (Delfini y Formica, 2001).

La adición de urea pudiera ser permitida, sin embargo, podría contribuir a la formación de carbamato de etilo un compuesto altamente cancerígeno. Las sales de amonio pudieran ser utilizadas, en lugar de otros compuestos, en mostos o vinos que tienen que ser refermentados, por ejemplo en la producción de vinos espumosos las más utilizadas son el sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y el fosfato ácido de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3$ , no es recomendada la adición de amonía ( $\text{NH}_3$ ), bicarbonato de amonio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) o carbonato de amonio  $((\text{NH}_4)_2\text{CO}_3)$  por que las últimas dos sales pueden contaminar con carbamatos, los cuales en el vino pueden convertirse en derivados cancerígenos de carbamato de etilo. La proteína

del mosto, como única fuente de nitrógeno en el medio sintético, no sólo soporta el crecimiento de numerosas cepas de levadura seleccionadas, sino también llevan a cabo la fermentación alcohólica (Delfini y Formica, 2001).

La fermentación alcohólica es una fase decisiva de la elaboración de un vino. Todas las cualidades de un vino ya existentes en la uva, se exteriorizan durante la vinificación, o por el contrario, desaparecen (Delanoe y Cols., 1988).

### **Características de la Fermentación en el Mosto de Uva**

En la fermentación del mosto de uva, el azúcar es transformada en alcohol y en gas carbónico bajo la acción de ciertos productos segregados por las levaduras que se han multiplicado en el medio. Nuestros sentidos pueden apreciar fácilmente este fenómeno. Se observa, en efecto las siguientes características (De la Llana, 1980):

1. Una efervescencia, semejante a la del agua que hierve y que se debe al desprendimiento de gas  $\text{CO}_2$ .
2. Un aumento de temperatura en el seno de la masa que fermenta.
3. Un cambio de sabor en el líquido puesto en fermentación, que de azucarado toma rápidamente un gusto alcohólico.
4. Una disminución de su densidad que se aproxima a la del agua y después se hace menor.
5. Un aumento de color, cuando está en contacto con hollejos de uvas coloreadas.

### **La Uva**

La vid es una planta perteneciente a la familia de las Ampelídeas y su fruto la uva (*vitis vinífera*) (Oreglia, 1978) es la materia prima empleada en la elaboración del vino, ésta es uno de los frutos más antiguos de los que el hombre



ha tenido conocimiento; es probable que el primer uso que recibió fuera como alimento, aunque una vez descubierta la forma de obtener vino y conocidas sus propiedades el mayor porcentaje de la producción, fuera utilizado para dichos fines (ASERCA, 2002).

El número de tipos de vides cultivadas en diversas zonas vinícolas es muy grande. Se diferencian por la forma y el crecimiento de las cepas, por la disposición y pilosidad de las hojas, por el color y forma de los granos y por el contenido de azúcar y el sabor de éstos, con frecuencia muy variable; a las variedades blancas y rojas adecuadas para la elaboración de vino se les conoce como uvas para prensar o viníferas, y a las destinadas a consumo directo uvas de mesa (Vogt y Lemperle, 1984).

Los azúcares predominantes en el fruto de las variedades de *Vitis vinífera* son la glucosa y la fructosa. En algunas variedades de *Vitis labrusca* se encuentran pequeñas cantidades de sacarosa y de otros azúcares y en sus híbridos la sacarosa puede constituir tanto como el 25% del azúcar total (Amerine y Ough, 1976).

### **Industria Vinícola en Sonora**

En Sonora el cultivo de la uva es relativamente reciente, pues data de la primera mitad de los años sesenta y en la actualidad es la entidad que mayor número de superficies dedica a este fruto (Tabla 2). Como se aprecia en la Tabla 2 el 84% de la uva industrial lo produce Sonora y Baja California; el primero para producir aguardiente y Brandy, el segundo para producir vinos; también observamos como Sonora tiene un porcentaje alto en relación a la participación en superficie de uva de mesa y de la misma manera para uva pasa, siendo muy baja la aportación de los demás estados.

Las zonas vitícolas de Sonora se dividen en dos: la Costa de Hermosillo y Caborca, produciéndose en ambas, celajes blancos y tintos. Con respecto a

Tabla 2. Principales entidades que participan en la producción de uva en México.

| <b>Entidad</b>        | <b>% de Participación En Superficie</b> | <b>% de Participación en Producción</b> |
|-----------------------|---|---|
| <b>Uva Industrial</b> |   |   |
| Sonora                | 62.86                                   | 74.46                                   |
| Baja California       | 21.7                                    | 14.51                                   |
| Zacatecas             | 5.97                                    | 3.73                                    |
| Coahuila              | 3.51                                    | 2.59                                    |
| Aguascalientes        | 2.83                                    | 2.35                                    |
| Otros                 | 3.13                                    | 2.35                                    |
| <b>Uva de Mesa</b>    |   |   |
| Sonora                | 70.28                                   | 72.62                                   |
| Zacatecas             | 20.34                                   | 18.4                                    |
| Guanajuato            | 1.37                                    | 1.31                                    |
| Durango               | 1.76                                    | 1.65                                    |
| Coahuila              | 4.31                                    | 4.48                                    |
| Otros                 | 1.94                                    | 1.54                                    |
| <b>Uva Pasa</b>       |   |   |
| Sonora                | 90.86                                   | 98.64                                   |
| Baja California       | 9.02                                    | 1.35                                    |
| Baja California Sur   | 0.12                                    | 0.01                                    |

Fuente: ASERCA, 2002.

Hermosillo el principal destino de la producción es el abastecimiento de las necesidades de la industria de la destilación, ya que de la producción total de dicha zona, el 79% tiene como fin este uso, el 19% como uva de mesa, siendo sólo un 2% para la producción de pasa; en el caso de Caborca, las cifras suelen ser distintas, ya que a la generación de uva pasa le corresponde el 42.7% de la producción total de la zona, siguiendo la destilación con 39.6% y la uva de mesa con 17.7% (ASERCA, 2002).

La viticultura en Sonora, desde sus inicios se enfocó a producir uva para la industria vinícola, mostrando un rápido crecimiento durante los setentas; en el año de 1981 se alcanzó la mayor superficie, con un poco más de las 24,000 has, sin embargo, a partir del año siguiente se inició una reducción, como resultado de la baja en la rentabilidad, aunado a la crisis económica de nuestro país durante esos años, provocando que para 1989 la superficie se reportaran en menos de 12,000 has, es decir, menos de la mitad de las cosechas al finalizar esta década (ASERCA, 2002).

En los últimos años, la uva industrial en Sonora ha seguido una tendencia de reducción; en el período de 1995-2000, la superficie disminuyó de 18,803 ha. a 10,008 ha. lo que representó una tasa de crecimiento negativa del orden de -9.9%; en términos absolutos, significó que se perdieron 8,795 has., en tan solo cinco años (Quiñones, 2005).

La uva industrial se utiliza para la elaboración de aguardiente; el proceso de producción de ésta implica la extracción del jugo de uva, el cual generalmente se deposita en los tanques de fermentación, para posteriormente separar el jugo fermentado de toda la materia sólida, destinando el jugo a la fermentación y obteniéndose el orujo o bagazo (cascarilla 35%, semilla 60% y el resto de pajillos) (ASERCA, 2002).

## El Vino

El vino es una bebida que se obtiene de la fermentación alcohólica del jugo de la uva fresca (Prescott y Dunn, 1982). Las principales operaciones que se llevan a cabo en la elaboración del producto son la vendimia, despalillado, molienda, prensado, maceración y fermentación la cual se lleva a cabo a través de la adición de levaduras, siendo las principales variedades *Saccharomyces cerevisiae* (o *ellipsoideus*) y *Saccharomyces* (Ough, 1992), como lo muestra el diagrama propuesto por Millar y Litsky (Fig. 2). En la Tabla 3 se muestra la composición química del vino en donde observamos que esta compuesto principalmente por agua, 88% en peso aproximadamente, minerales (fósforo, magnesio, calcio, hierro, zinc, sodio, potasio y yodo), vitaminas y 9% de alcohol (USDA, 2004).

En la actualidad se conocen tres tipos de vinos, vino blanco, vino rosado y vino rojo, los cuales se diferencian por la variedad de la uva de la que provienen, así como del tratamiento que se le da a cada uno de ellos para la obtención del producto terminado (Vine, 2002).

Entre las bebidas preparadas por el hombre en el curso de los siglos, el vino ha sido la más importante y la que ha desempeñado más destacado papel (Vogt y Lemperle, 1984).

### **Compuestos Nitrogenados**

En los mostos y vinos se ha encontrado un gran número de compuestos que contienen nitrógeno, tales como amoniaco, aminoácidos, proteínas, vitaminas, aminas y nitratos. Los compuestos nitrogenados son de gran importancia en el desarrollo de las levaduras y en algunos casos pueden representar un factor limitante. La presencia de ciertos compuestos de nitrógeno puede ser perjudicial (Amerine y Ough, 1976).

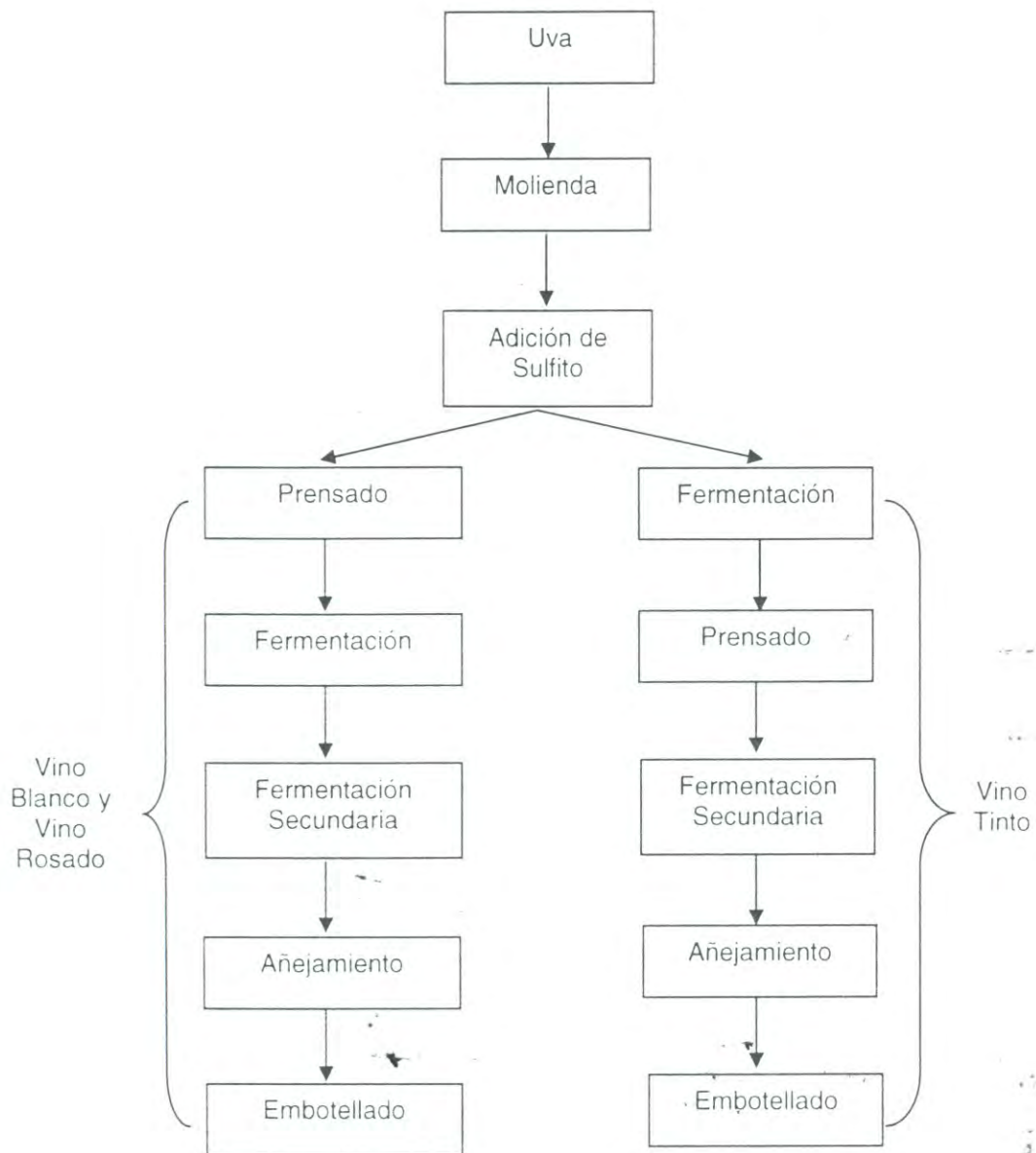


Figura 2. Diagrama de flujo para la elaboración del vino.

Fuente: Modificado de Miller y Litsky (1976).

Tabla 3. Composición química promedio del vino tinto de mesa.

| <b>Nutriente</b>               | <b>Valor /100 g</b> |
|--------------------------------|---------------------|
| <b>Componente</b>              |                     |
| Agua                           | 88.50 g             |
| Energía                        | 72 kCal             |
| Proteínas                      | 0.20 g              |
| Lípidos totales                | 0.00 g              |
| Cenizas                        | 0.30 g              |
| Carbohidratos (por diferencia) | 1.70 g              |
| <b>Minerales</b>               |                     |
| Calcio, Ca                     | 8 mg                |
| Hierro, Fe                     | 0.43 mg             |
| Magnesio, Mg                   | 13 mg               |
| Fósforo, P                     | 14 mg               |
| Potasio, K                     | 112 mg              |
| Sodio, Na                      | 5 mg                |
| Zinc, Zn                       | 0.09 mg             |
| Cobre, Cu                      | 0.020 mg            |
| Manganeso, Mn                  | 0.597 mg            |
| Selenio, Se                    | 0.2 µg              |
| <b>Vitaminas</b>               |                     |
| Tiamina                        | 0.005 mg            |
| Riboflavina                    | 0.028 mg            |
| Niacina                        | 0.081 mg            |
| Ácido Pantoténico              | 0.035 mg            |
| Vitamina B-6                   | 0.034 mg            |
| Folato total                   | 2 µg                |
| Ácido fólico                   | 0 µg                |
| Vitamina B-12                  | 0.01 µg             |
| <b>Otros</b>                   |                     |
| Etanol                         | 9.3 g               |

Fuente: USDA, 2004.

La cantidad de aminoácidos en vinos y mostos es variable; en la tabla 4 se muestra el rango en el que se han encontrado las cantidades de aminoácidos publicados en diferentes trabajos. En esta tabla se observa como la cantidad máxima de algunos aminoácidos es muy elevada en mostos y vinos como es el caso de la prolina, que tiene niveles mas altos reportados de 4,600 y 3,200 para mostos y vinos respectivamente seguida de la arginina y el acido glutámico. Estos niveles son muy importantes ya que estos niveles de aminoácidos en mostosson sometidos a la fermentación y pueden intervenir en la generación de carbamato de etilo ya que la arginina juega un papel muy importante en su producción (Butzke y Bisson, 1997). Para vinos se ha reportado que el nivel máximo también es para prolina, seguido de ácido glutámico y treonina (Amerine y Ough, 1976).

## **Bondades del Vino**

Es bien conocido que el vino posee algunos beneficios a la salud humana y descubrimientos recientes hechos por un grupo de investigadores del Boletín Ciencia Vino y Salud (BCVS) publicado en Chile, indican que se han reportado estudios epidemiológicos basados en el análisis de dietas ricas en frutas, verduras y vino, que asocian el consumo de polifenoles, especialmente flavonoides (antioxidantes), con menor mortalidad y también menor mortalidad por enfermedad coronaria. Estos investigadores mencionan que el consumo moderado de vino protege la función endotelial de aquellos individuos alimentados con dieta hipergrasa y la mejora en los individuos alimentados con dieta rica en frutas y verduras. El aporte de antioxidantes de dos copas de vino rojo al día, en las personas, protege el ADN del daño que produce una dieta rica en grasas y confiere protección adicional en una dieta tipo mediterránea, es decir, la suplementación con vino rojo lleva a niveles de daño oxidativo del ADN muy bajos, no importando el tipo de dieta (BCVS, 2000).

Tabla 4. Aminoácidos en mostos y vinos.

| Aminoácidos                   | Mostos (mg/L) |        | Vino (mg/L) |        |
|-------------------------------|---------------|--------|-------------|--------|
|                               | Mínimo        | Máximo | Mínimo      | Máximo |
| Alanita                       | 10            | 632    | 1           | 247    |
| Ácido $\alpha$ -aminobutírico | 9             | 420    | 2           | 90     |
| Arginina                      | 4             | 2360   | 3           | 151    |
| Asparagina                    | 24            | 24     | 1           | 2      |
| Ácido aspártico               | 0             | 290    | 1           | 107    |
| Cisterna                      | 0             | 2      | 1           | 2      |
| Cistina                       | 0             | 5      | 9           | 66     |
| Ácido glutámico               | 0             | 1330   | 1           | 390    |
| Glutamina                     | 24            | 97     | 1           | 310    |
| Glicina                       | 2             | 29     | 1           | 67     |
| Histidina                     | 7             | 143    | 4           | 150    |
| Hidroxiprolina                |               |        | 1           | 4      |
| Isoleucina                    | 0             | 100    | 2           | 57     |
| Leucina                       | 9             | 88     | 9           | 198    |
| Lisina                        | 0             | 74     | 1           | 248    |
| Metionina                     | 0             | 119    | 2           | 44     |
| Ornitina                      |               |        | 1           | 10     |
| Fenilalanina                  | 0             | 122    | 3           | 199    |
| Prolina                       | 0             | 4600   | 0           | 3400   |
| Serina                        | 5             | 822    | 1           | 355    |
| Treonina                      | 10            | 400    | 1           | 382    |
| Triptófano                    | 0             | 65     | 0           | 15     |
| Tirosina                      | 0             | 58     | 1           | 120    |
| Valina                        | 0             | 88     | 1           | 101    |

Fuente: Amerine y Ough, 1976.



## Toxicidad de Bebidas Alcohólicas

Algunos estudios epidemiológicos realizados para la IARC han indicado que las bebidas alcohólicas, entre las cuales se encuentran el vino y cerveza, están relacionadas de manera casual con cáncer en la cavidad oral y en la laringe, se ha relacionado de manera importante con el cáncer de pecho en muchos países (IARC, 1988).

Existe suficiente evidencia del poder cancerígeno de las bebidas alcohólicas en los seres humanos y por lo tanto se les considera dentro del grupo I de la IARC; en esta categoría se encuentran compuestos o mezclas que presentan evidencia de que el agente puede producir cáncer en seres humanos, o bien, que su potencial cancerígeno en seres humanos no es suficiente, pero existe evidencia de su poder en animales experimentales y evidencia fuerte en humanos expuestos al agente (IARC, 1988).

Las concentraciones del etanol retenidas en los seres humanos en el tracto gastrointestinal superior después del consumo de bebidas alcohólicas pueden causar irritación local. A largo plazo, el beber de manera excesiva bebidas alcohólicas puede también causar: hígado graso, hepatitis alcohólica, necrosis celular, fibrosis y cirrosis hepática (IARC, 1988).

### **Toxicidad en Vino**

Se ha estudiado que el vino a pesar de sus bondades también puede presentar algunos compuestos de toxicidad significativa; entre ellos encontramos:

- A) Micotoxinas: especialmente Ocratoxina A.
- B) Alcoholes: Metanol, n-propanol, isopropanol, alcoholes superiores y etanol.
- C) Metales Pesados: Plomo, arsénico y cadmio.
- D) Metabolitos no alcohólicos: Carbamato de etilo y acetaldehído, entre otros.

## Metabolitos No Alcohólicos

Los metabolitos no alcohólicos son compuestos formados durante la fermentación bajo distintos mecanismos de reacción.

### Carbamato de Etilo

El carbamato de etilo ( $\text{NH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ) también llamado uretano (Winter, 2002; Herbert y Cols., 2002), es un compuesto natural (Lau y Cols., 1987) que se presenta en los alimentos fermentados y bebidas donde la actividad microbiológica ha sido una parte integral del proceso de producción; Allen y Cols. (1986), Mirvish (1968), Pereira y Cols. (1991) y Zimmerli y Schlatter (1991) (citados por Woo y Cols., 2001) indican que este es un compuesto genotóxico in vitro e in vivo es carcinogénico en ratas y ratones de laboratorio.

El carbamato de etilo se ha convertido recientemente en un tema de preocupación ya que éste se ha encontrado en algunas bebidas alcohólicas a niveles mucho más altos de los que se esperaría como resultado del proceso de la fermentación. Esta sustancia carcinogénica ha aparecido en bebidas alcohólicas en el pasado como resultado del uso de pirocarbonato dietílico, un agente antimicrobiano cuyo uso no está permitido en Canadá (Bailey y Cols., 1986).

### **Formación del Carbamato de Etilo**

Battaglia y Cols. (1990), McGill y Morley (1990), Monteiro y Cols. (1989) y Ough y Cols. (1990) (citados por Woo y Cols., 2001) indican que el carbamato de etilo es formado de la reacción de la urea y el etanol. Ough (1976) (citado por Ya-Ping y Cols., 1995) asegura que el carbamato de etilo se encuentra en la mayoría de los alimentos fermentados y bebidas alcohólicas. Según Tatken y Lewis (1981) (citado por Ya-Ping y Cols., 1995) se ha comprobado que este es un químico carcinogénico.

Uno de los aminoácidos más importantes en el jugo de la uva y que se encuentra disponible para ser metabolizado por la levadura es la arginina. Ésta es tomada por la levadura del mosto como nutriente, y puede ser metabolizada para producir urea si se encuentra en cantidades en exceso (Fig. 3) (Butzke y Bisson, 1997; Woo y Cols., 2001). Si las concentraciones de arginina en el jugo exceden 1000 mg/L, el viñedo se considera como sobre fertilizado (Butzke y Bisson, 1997). De la misma manera si la urea no es metabolizada y se acumula en concentraciones críticas, las cepas de levadura la pueden producir excretándola durante o al final de la fermentación. Se recomienda que el contenido de urea en mostos debe ser menor a 2 mg/L para mantener la concentración de carbamato de etilo en niveles aceptables (Kodama y Cols., 1994). La reacción química entre la urea y el etanol es exponencialmente acelerada a elevadas temperaturas (Butzke y Bisson, 1997).

Almy y Ough (1996) reporta que los viñedos fertilizados en exceso con urea, amoníaco u otros fertilizantes con nitrógeno (Butzke y Bisson, 1997) son probablemente la causa principal de la urea residual en el vino por el alto contenido de nutrientes de nitrógeno en el jugo (Almy y Ough, 1996; Ferrari, 2002).

La fertilización con nitrógeno de los viñedos tiene influencia directa en los contenidos de nitrógeno de las uvas y de los mostos resultantes. Beltran y Cols. (2005) indican que los cambios en los niveles de nitrógeno influyen en el aroma y compuestos de desecho particularmente el sulfuro de hidrógeno y en las cantidades de urea. Las fuentes principales de nitrógeno en el mosto son el amoníaco y los aminoácidos con excepción de la prolina (Butzke y Bisson, 1997).

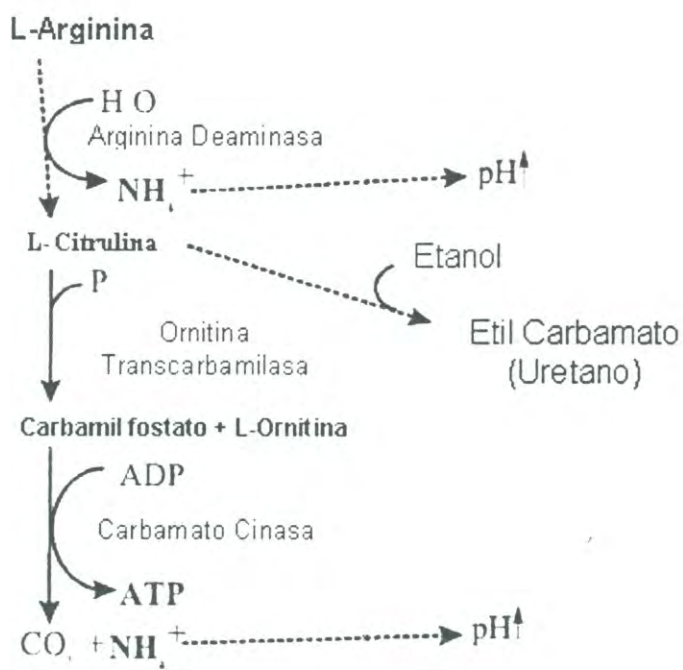


Figura 3. Degradación de la Arginina.

Fuente: Mira de Orduña y Colís. (2001).

Las cepas de levadura y la temperatura de fermentación puede también causar incremento en la acumulación de la urea (Almy y Ough, 1996). Liu y Cols. en 1994 (citado por Mira de Orduña y Cols., 2000) indican que la actividad metabólica de las bacterias ácido lácticas del vino también permiten la producción de precursores de carbamato de etilo en el vino.

### **Toxicidad del Carbamato de Etilo**

En 1943 se descubrió que el carbamato de etilo tiene efecto cancerígeno en animales; se ha mostrado que dosis de 0.1-12.5 mg de carbamato de etilo/kg de peso corporal, induce a la formación de tumores en ratas, ratones y hámster después de la administración tanto por vía oral como por inhalación (Schlatter y Lutz, 1990). La Agencia de Protección al Medio Ambiente (EPA) no ha reportado al carbamato de etilo como carcinogénico pero la IARC lo ha clasificado a dentro del grupo 2B, como posible carcinogénico para los humanos (Winter, 2002).

Debido a su ligera lipofilia, el carbamato de etilo penetra en el sistema nervioso central donde ejerce una acción sedante y anestésica; sobre esta base se ha utilizado en medicina humana y veterinaria como agente hipnótico (De la Torre y Buxaderas, 2004).

Winter (2002) asegura que la exposición aguda de altos niveles de carbamato de etilo en humanos puede causar lesión en el hígado y riñón y puede inducir vómito, coma o hemorragias. También la IARC (1974) ha reportado que la exposición alta a carbamato de etilo en ratones, ratas y hámsteres, los cuales han sido expuestos a este compuesto por administración oral, inhalación, subcutáneas o intraperitoneales, puede provocar tumores del pulmón, linfomas, hepatomas, melanomas y tumores vasculares.

## **Papel de la Temperatura de Fermentación en la Producción de Carbamato de Etilo**

Azevedo y Cols. (2002) indican en su estudio, que se formó carbamato de etilo durante el calentamiento del vino a 80°C por 48 horas. De igual forma, Ough y Cols. (1988) (citado por Tegmo-Larsson y Henick-Kling, 1990) muestran que la aplicación de temperaturas altas en la fermentación hace que el etanol sea convertido en carbamato de etilo. Morassut y Cecchini (1999) muestran que es importante mantener la temperatura menor o igual a 35°C durante la elaboración de vino con el fin de prevenir la formación de carbamato de etilo. De todos los trabajos anteriores ninguno presenta un mecanismo propuesto para las condiciones de formación del compuesto.

En un estudio realizado en licor japonés en donde las muestras fueron expuestas a la luz a temperaturas altas y a la oscuridad a temperaturas bajas, la cantidad de carbamato de etilo formado fue mayor para aquellas que se expusieron al segundo método (Suzuki y Cols., 2001). Se ha reportado también que el tiempo de almacenamiento y la temperatura juegan un rol importante en la formación de carbamato de etilo para vinos coreanos (Woo y Cols., 2001).

### **Legislaciones para Carbamato de Etilo**

Battaglia y Cols. (1990), Cairns y Cols. (1987), Joe y Cols. (1977), Sen y Cols. (1992) y Zimmerli y Schlatter (1991) (citados por Woo y Cols., 2001) aseguran que desde que la Directiva de Control de Licores de Ontario, Canadá detectó niveles traza de carbamato de etilo en varias bebidas alcohólicas, incluyendo algunos tipos de vino, whisky y brandy en 1985; se han realizado numerosos estudios en los métodos de determinación y del nivel del compuesto en gran variedad de alimentos fermentados así como en bebidas alcohólicas. Winter (2002) reporta que el uretano se ha encontrado en vino, cerveza, jugo de naranja, algunos bebidas suaves, pan, salsa de soya y yogurt. La Administración

de Alimentos y Fármacos (FDA) indica la necesidad de mantener niveles bajos de carbamato de etilo en vinos (Almy y Ough, 1996). De la misma manera, regulaciones canadienses para alimentos y medicamentos indican que el gobierno federal Canadiense ha introducido límites regulatorios del control de la incidencia del tóxico, en bebidas alcohólicas (Ya-Ping y Cols., 1995). Para minimizar la exposición pública del carbamato de etilo, en diciembre de 1985 la Asociación de Bienestar y Salud de Canadá publicó lineamientos limitando los niveles del compuesto, en donde podemos observar que para vinos de mesa el límite máximo permitido es de 30 ppb, para vinos fortificados (oportos y jerez) es de 100 ppb, 150 ppb para alcoholes destilados y 400 ppb para brandy de frutas y licores (Lau y Cols., 1987).

### Acetaldehído

Los aldehídos son compuestos caracterizados por el grupo funcional aldehídico  $-CHO$ . Éstos se pueden considerar como productos de oxidación por degradación de los alcoholes primarios. Una oxidación posterior convierte los aldehídos en ácidos. El principal aldehído del vino es el acetaldehído:  $CH_3 - CHO$ , (Romano y Cols., 1994) con peso molecular de 34.02. El acetaldehído es un líquido incoloro, volátil a temperatura y presión ambiente; puro posee un olor irritante, pero a concentraciones diluidas contribuye a formar un aroma agradable a frutas, su punto de ebullición es a  $21^\circ C$ , es soluble en agua, alcohol y éter, y polimeriza fácilmente. Este compuesto se combina con los alcoholes monovalentes (alcohol etílico, metílico, propílico, isobutírico, amílico, isoamílico, etc.) con eliminación de una molécula de agua y formación de acetales (Oreglia, 1978). Se utiliza extensamente como sabor artificial de frutas (Arctander, 1969 citado por Miyake y Shibamoto, 1993). Nykanen (1986) (citado por Romano y Cols., 1994) indica que los aldehídos juegan un papel importante en el aroma y bouquet del vino.

## Formación del Acetaldehído

El acetaldehído en el vino es producido por el metabolismo de la levadura durante la fermentación (Schreirer, 1979 citado por Romano y Cols., 1994). Se forma a partir del piruvato por mediación de las enzimas vía glicolítica (Amerine y Ough, 1976). Beech (1993) (citado por Herrero y Cols., 2003) asegura que durante la fermentación la levadura *Saccharomices cerevisiae spp.* puede producir aparte de acetaldehído, ácido pirúvico y 2-oxoglutarico. Wildenradt y Singleton (1974) (citado por Saucier y Cols., 1997) proponen otro método de producción del acetaldehído, en el cual se lleva a cabo la oxidación del etanol por los compuestos fenólicos en presencia de oxígeno. Según algunos autores la acumulación del acetaldehído durante la fermentación depende de un equilibrio entre las enzimas alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa (Romano y Cols., 1994).

El acetaldehído es un producto normal de la fermentación y estas cantidades pueden variar de 10 mg/L hasta 300 mg/L según Schreirer (1979) (citado por Romano y Cols., 1994). En vinos blancos el acetaldehído es observado como un indicador del estado de oxidación del vino, mientras que en vinos rojos este debe de estar presente en cantidades por arriba de 100 mg/L pero en cantidades de 500 mg/L, el vino es considerado como no comercial, sin embargo, existen autores que afirman lo contrario, tal es el caso de Teixeira (1940) (citado por Romano y Cols., 1994) quien indica que un vino con alto contenido de acetaldehído es considerado como un vino con alta calidad.

## Toxicidad del Acetaldehído

En un estudio realizado para la IARC con trabajadores expuestos a varios aldehídos, se encontró una frecuencia relativa de tumores bronquiales y en la cavidad oral en nueve casos de cáncer; los tumores del esófago se han asociado con altos niveles de acetaldehído después del consumo de alcohol (IARC, 1999), sin embargo no hay suficientes datos para confirmar su poder cancerígeno en



humanos, pero en estudios realizados con animales se pudo confirmar, que se encuentra dentro de la categoría 2B (IARC, 1999).

### **Formación del Acetaldehído durante la Fermentación con *Saccharomices cerevisiae***

Las levaduras también contribuyen a la formación de acetaldehído. Algunos estudios indican que existe un riesgo en el uso de levaduras diferentes de *Saccharomices* en la fermentación del vino, ya que están relacionadas con la habilidad de producir metabolitos como acetaldehído y ácido acético en cantidades indeseables para la calidad del vino (Rojas y Cols., 2003).

La habilidad de producir acetaldehído es una propiedad de las diferentes levaduras del vino, algunos estudios indican que las cepas de *S. cerevisiae* producen relativamente altos niveles del compuesto en un rango de 50 a 120 mg/L, mientras que otras levaduras como *Kloeckera apiculata*, *Candida krusei*, *Candida stellata*, *Hansenula anomala* y *Metschnikowia pulcherrima* producen bajos niveles en cantidades no detectables (Romano y Cols., 1994).

El acetaldehído contribuye al aroma principal del vino generado durante su oxidación (Escudero y Cols., 2002). Rapp y Mandery (1986) y Nykanen y Soumalainen (1983) (citados en Mallouchos y Cols., 2003) indican que el aroma del vino es una combinación compleja de los componentes que dan a cada uno esta característica distintiva. También se ha demostrado que otros compuestos que proporcionan aroma al vino son acetatos y ésteres etílicos, alcoholes superiores, otros aldehídos, ácidos grasos y cetonas, todos ellos producidos durante la fermentación.

## **Papel de la Temperatura de Fermentación en la Producción del Acetaldehído**

Según Jackson (1994) (citado en Mallouchos y Cols., 2003) uno de los factores más importantes que se ha estudiado y que afecta el aroma del vino es la temperatura de fermentación; productores de vino reconocen que el vino producido a bajas temperaturas tiene mas aroma a fruta, ya que la síntesis incrementa y/o reduce la hidrólisis de esteres. El laboratorio de Waterhouse (2006) de la Universidad de California publica que las concentraciones de acetaldehído incrementan en el vino con las altas temperaturas. La temperatura de fermentación pudiera afectar el contenido de acetaldehído pero los reportes son controversiales; Amerine y Ough (1964) reportaron que la temperatura de fermentación no afecta grandemente el contenido final de aldehídos, mientras que otros autores como Wucherpfenning y Semmeler (1972) y Karklinya y Liyelpetere (1985) han encontrado que los contenidos de acetaldehído incrementan con el aumento de las temperaturas de fermentación (Romano y Cols., 1994).

Amerine y Ough (1976) indican que se pueden presentar variaciones importantes en las cantidades de los compuestos presentes en vinos debido a las altas temperaturas de fermentación y a una buena aireación. Una combinación de lo anterior da como resultado un incremento en la formación de acetaldehído.

## **Otros Factores de la Fermentación en la Producción de Acetaldehído**

Bennetzen y Hall (1982) indican que la formación del acetaldehído se puede llevar a cabo bajo condiciones de crecimiento aeróbico, y que la composición del medio o la naturaleza de los materiales insolubles utilizados para la clarificación de los mostos también es parte de su formación; según Bayer (1966) (citado por Romano y Cols., 1994) los niveles de acetaldehído presentes en vinos incrementan durante su añejamiento debido a la oxidación del alcohol etílico, a la actividad de las levaduras, o a la aireación. El uso de altas concentraciones de

dióxido de azufre en la fermentación del mosto de uva, causa un incremento considerable en los niveles del compuesto por las células de levadura.

Zoecklein y Cols. en 1990 indicaron que el acetaldehído es también un intermediario en la formación bacteriana del ácido acético y que en condiciones de poco oxígeno y/o niveles de alcohol por arriba de 10% (vol/vol), el acetaldehído tiende a acumularse en vez de ser oxidado a ácido acético .

### **Papel de la Temperatura y la Inmovilización de la Enzima Deshidrogenasa en la Fermentación para la Producción de Acetaldehído**

Las diferencias en las cantidades de acetaldehído producido pueden reflejar el efecto de la temperatura y la inmovilización en la actividad del alcohol deshidrogenasa, responsable del paso de aldehídos a alcoholes por una reducción (Mallouchos y Cols., 2003). Yajima y Yokotsuka (2001), Bardi y Koutinas (1994), y Bakoyianis y Cols. (1993) han reportado la combinación de los efectos de la temperatura y la inmovilización de la enzima en la formación de compuestos volátiles durante la fermentación del vino (Mallouchos y Cols., 2003).

### **Legislaciones para Acetaldehído**

Como ya se mencionó anteriormente, el aldehído principal de los vinos es el acetaldehído. Maarse y Vischer (1989) (citado por Ferreira y Cols., 2004) indican que este compuesto puede encontrarse por arriba de 300 mg/L. De acuerdo a la NMX-V-012-1986 el valor máximo permitido para acetaldehído en vinos es de 40 mg de acetaldehído por cada 100 mL de alcohol anhidro. En la Tabla 5 se observan niveles de acetaldehído encontrados en algunos mostos y vinos. En los vinos tipo jerez de los países en general se presenta el máximo nivel de acetaldehído de 218 mg/L, seguido del vino de mesa de California 126 mg/L y del vino de mesa de Alemania de 105.4 mg/L.

En vinos fermentados es de mínima importancia sensorial niveles de acetaldehído mayores de 75 mg/L. Zoecklein y Cols. (1990) reportan que valores que se encuentran en el rango de 100-125 mg/L son el límite para obtener un sabor agradable en el producto final. A niveles por arriba de estos valores, el compuesto puede producir aromas de manzanas maduras, nuez o jerez.

Liu y Pilone en el año 2000 indicaron los niveles máximos permitidos en varios vinos, entre los cuales se encuentra el vino tinto, se pueden observar en la Tabla 6. En ella se observa como el nivel máximo permitido es en el vino de cereza es en un rango de 90-500 mg/L, seguido del vino blanco, brandy, vino dulce y vino rojo. Observamos que para el vino rojo el nivel máximo permitido es uno de los más bajos en relación a otras bebidas alcohólicas.

Tabla 5. Concentraciones de acetaldehído encontradas en vinos.

| <b>País</b> | <b>Tipo de Vino</b> | <b>Número de Muestras</b> | <b>Intervalo Acetaldehído (mg/L)</b> | <b>Intervalo Promedio Acetaldehído (mg/L)</b> |
|-------------|---------------------|---------------------------|--------------------------------------|---|
| General     | Mesa                | 764                       | 3-494                                | 54.4  |
|             | Postre              | 415                       | 15-264                               | 86.8  |
|             | Jerez               | 25                        | 90-500                               | 218   |
| Alemania    | Mesa                | 4                         | 33-79                                | 58.2  |
|             |                     | 6                         | 3-45                                 | 21  |
|             |                     | 7                         | 40-238                               | 105.4   |
| Francia     | Mesa                | 40                        | 14-71                                | 24.6  |
| EE. UU.,    | Mesa                | 4                         | 32-91                                | 69.3  |
| California  | Postre              | 2                         | 40-85                                | 62.7  |
|             | Jerez               | 2                         | 104-248                              | 126   |

Fuente: Amerine y Ough, 1976.

Tabla 6. Niveles de acetaldehído en bebidas alcohólicas.

| <b>Tipo</b>    | <b>Acetaldehído (mg/L)</b> |
|----------------|----------------------------|
| Vino Rojo      | 4-212                      |
| Vino Blanco    | 11-493                     |
| Vino Dulce     | 188-248                    |
| Vino de Cereza | 90-500                     |
| Brandy         | 63-308                     |
| Coñac          | 105                        |

Fuente: Liu y Pilone., 2000.

# METODOLOGÍA

## Materia Prima

Se utilizó uva roja Carignane cosechada en la costa de Hermosillo proporcionada directamente por la Empresa Casa Pedro Domecq Hermosillo en la vendimia 2005. La uva Carignane representa el 75% de la uva que recibe la planta. El viñedo seleccionado con nombre "La Esperanza" ingresa el porcentaje mayoritario de esta variedad de uva y se encuentra ubicado en la costa de Hermosillo.

## Preparación de las Muestras de Vino

La uva fue transportada del viñedo a la Planta por medio de tolvas metálicas y se siguió el criterio de rechazo de la empresa de °Bx de 17-22. La uva fue tomada al azar del área de molinos de la planta por medio de cubetas para posteriormente ser pesada. Se utilizaron muestras de 20 kg de uva por cada fermentación. Se realizaron 45 fermentaciones en bloques de 9 siguiendo el diseño experimental.

Para llevar a cabo la molienda se utilizó un molino experimental de rodillos y la uva fue despallada manualmente. De la uva molida se tomaron 200 ml de jugo para proceder a la preparación del caldo iniciador, éste consistió en la adición de 0.16 mg de levadura comercial (para obtener una concentración de 8 µg/kg de uva en el mosto) y 0.40 mg de fosfato de sodio (para obtener una concentración de 20 µg/kg de uva) y se mezcló la solución por 2 min. Se agregaron concentraciones de enzima pécica comercial a la uva molida de 9 y 18 µg enzima/kg de uva de acuerdo al diseño experimental. Se dejó en reposo para que la enzima empezara a actuar por un tiempo aproximado de 4 h (maceración) a temperatura ambiente (aproximadamente 30°C). Transcurrido el tiempo de maceración se agregó el caldo iniciador a cada cubeta que contenía el jugo de uva

y se agitó manualmente por 2 min; éste se prensó separando el orujo del líquido, por medio de coladores caseros, el orujo fue de nuevo prensado en una prensa hidráulica experimental para extraer el jugo restante. Todo el jugo fue filtrado en manta y colocado en el fermentador experimental cuyo diseño se explica más adelante. El jugo se sometió a las condiciones del diseño experimental para posteriormente iniciarse la fermentación.

### **Diseño de Fermentadores Experimentales**

Para llevar a cabo las fermentaciones se construyeron nueve fermentadores de acero inoxidable. Los fermentadores medían 35 cm de altura y 28 cm de diámetro. Todo el fermentador fué de acero inoxidable, desde el cilindro hasta las tapas. Las tapas contenían tres orificios en la parte superior, uno era para el termómetro, otro para la salida de gases y el último para el regreso de la muestra cuando se tomaban las alícuotas en exceso. Para obtener las muestras homogéneas se colocó en medio del fermentador una propela de 25 cm de largo con una paleta de 5 cm de ancho y 15 cm de largo. Ésta se hacía girar con ayuda de un motoreductor de 80 rpm (Fig. 4).

### **Diseño Experimental y Análisis Estadístico**

El diseño consistió en seleccionar 3 temperaturas de fermentación las cuales fueron de 20, 30, 35°C. Las concentraciones de enzima péctica utilizadas fueron 0 ( $C_0$ ), 9 ( $C_1$ ) y 18 ( $C_2$ )  $\mu$ L enzima/kg de uva. La concentración de enzima 0 fue utilizada como control y las otras para comparar su comportamiento con la primera.  $C_2$  es la concentración de enzima recomendada por el proveedor y  $C_1$  la mitad de ésta. En relación al tiempo de fermentación para 35°C las muestras se tomaron cada 4 h, para 30°C cada 6 h y para la temperatura de 20°C cada 12 h. Se realizaron 3 repeticiones de cada uno de los tratamientos (Tabla 7).



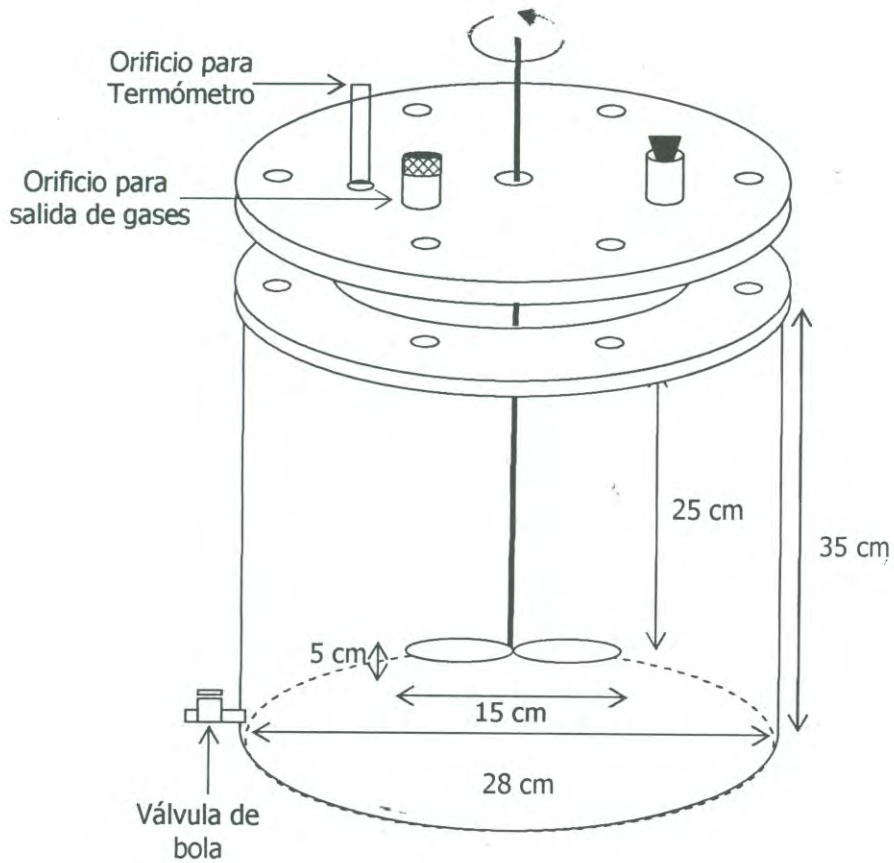


Figura 4. Diagrama de fermentador experimental empleado para llevar a cabo la fermentación de la uva Carigñane.

Tabla 7. Cuadro del diseño experimental que indica las temperaturas, concentraciones de enzima y tiempos utilizados en el estudio.

|                | T <sub>1</sub>                               |  |  | T <sub>2</sub>                               |  |  | T <sub>3</sub>                               |  |  |
|----------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|                | C <sub>0</sub>                               | C <sub>1</sub>                               | C <sub>2</sub>                               | C <sub>0</sub>                               | C <sub>1</sub>                               | C <sub>2</sub>                               | C <sub>0</sub>                               | C <sub>1</sub>                               | C <sub>2</sub>                               |
| t <sub>1</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>0</sub> t <sub>1</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>1</sub> t <sub>1</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>2</sub> t <sub>1</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>0</sub> t <sub>1</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>1</sub> t <sub>1</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>2</sub> t <sub>1</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>0</sub> t <sub>1</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>1</sub> t <sub>1</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>2</sub> t <sub>1</sub> |
| t <sub>2</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>0</sub> t <sub>2</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>1</sub> t <sub>2</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>2</sub> t <sub>2</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>0</sub> t <sub>2</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>1</sub> t <sub>2</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>2</sub> t <sub>2</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>0</sub> t <sub>2</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>1</sub> t <sub>2</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>2</sub> t <sub>2</sub> |
| t <sub>3</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>0</sub> t <sub>3</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>1</sub> t <sub>3</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>2</sub> t <sub>3</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>0</sub> t <sub>3</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>1</sub> t <sub>3</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>2</sub> t <sub>3</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>0</sub> t <sub>3</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>1</sub> t <sub>3</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>2</sub> t <sub>3</sub> |
| t <sub>4</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>0</sub> t <sub>4</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>1</sub> t <sub>4</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>2</sub> t <sub>4</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>0</sub> t <sub>4</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>1</sub> t <sub>4</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>2</sub> t <sub>4</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>0</sub> t <sub>4</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>1</sub> t <sub>4</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>2</sub> t <sub>4</sub> |
| t <sub>5</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>0</sub> t <sub>5</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>1</sub> t <sub>5</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>2</sub> t <sub>5</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>0</sub> t <sub>5</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>1</sub> t <sub>5</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>2</sub> t <sub>5</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>0</sub> t <sub>5</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>1</sub> t <sub>5</sub> | T <sub>1</sub> C <sub>2</sub> t <sub>5</sub> |

T: Temperatura de Fermentación. T<sub>1</sub>=20°C, T<sub>2</sub>=30°C, T<sub>3</sub>=35°C.

C: Concentración de enzimas pécicas. C<sub>0</sub>=0μL enzima/kg de uva, C<sub>1</sub>=9μL enzima/kg de uva, C<sub>2</sub>=18μL enzima/kg de uva.

t: Tiempo de fermentación (h).

Se utilizó un diseño de parcelas divididas, donde se aleatorizó la concentración de enzimas pécticas y las repeticiones para cada una de las temperaturas del experimento. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando los paquetes estadísticos JMP versión 4.0 y Sigma Plot 2001.

Las alícuotas se tomaron de acuerdo al tiempo que duró la fermentación y éstas fueron analizadas. En el caso de la fermentación de 35°C el tiempo de fermentación fue de 28 h, para 30°C de 42 h y para 20°C de 117 h. En la Figura 5 se observan las operaciones para la preparación de la muestra y la toma de alícuotas durante el proceso de fermentación.

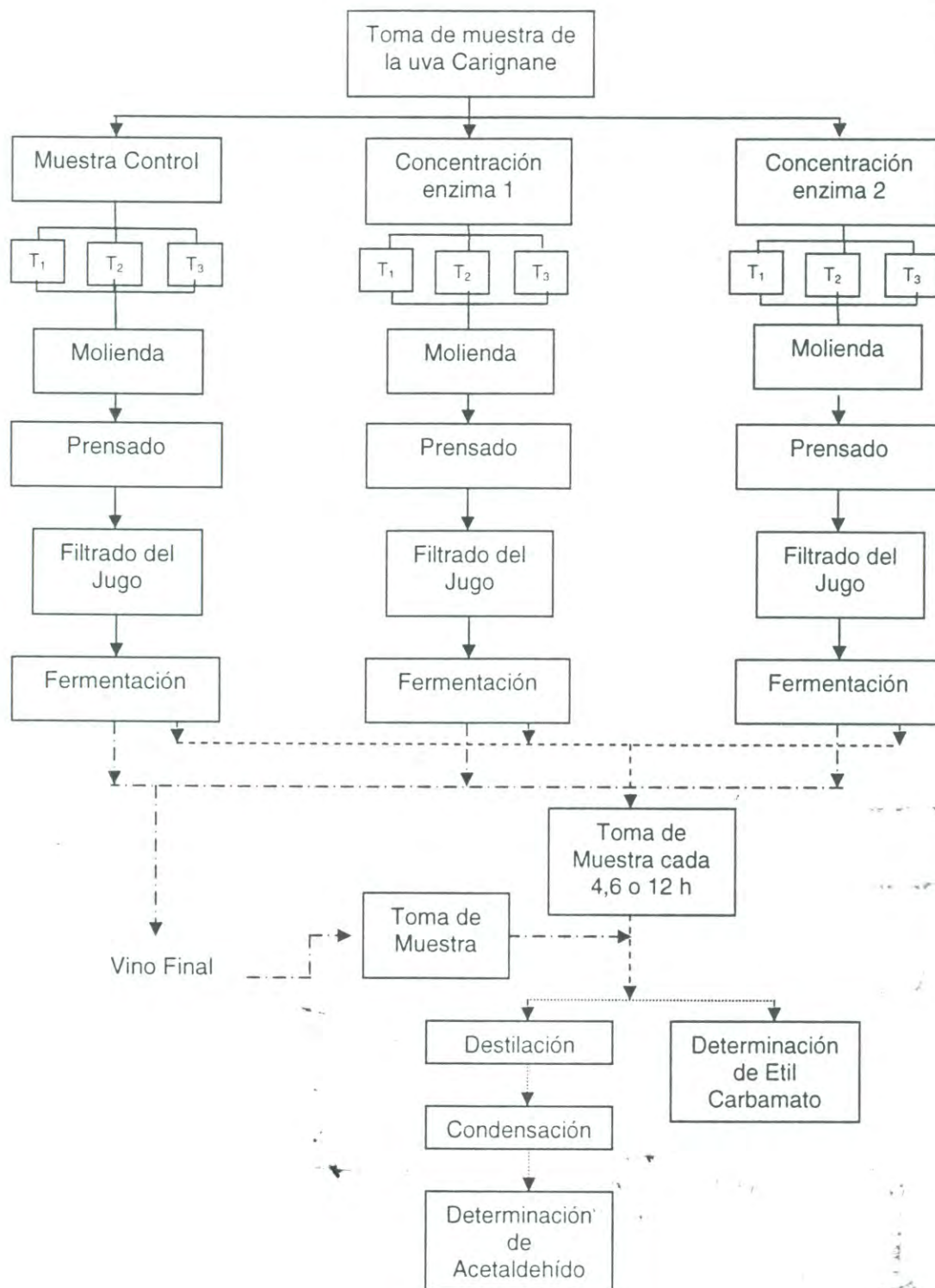
### **Determinación del Grado Brix (°Bx)**

Los °Bx indican el contenido de azúcar en las mezclas y éstos son el peso en gramos de materia seca contenido en 100 g de una solución de agua destilada, y es una manera indirecta de medir la cantidad de azúcares presentes en la solución (Paltrinie y Figuerola, 1993).

La medición de °Brix se realizó por medio de un densímetro aplicando el principio de Arquímedes. Ésta consistió en la toma de 300 ml de muestra en una probeta y se observa la lectura correspondiente. La medición fue realizada a 20°C (a temperatura diferente se realizó una corrección utilizando tablas ICUMSA 1998).

### **Determinación del Porcentaje Alcohol-Volumen**

La determinación del porcentaje alcohol-volumen se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-142-SSA1-1995. Con esta técnica se determina el porcentaje alcohol-volumen en vinos y aguardientes por medio de una destilación de la muestra. La destilación consiste en una separación de los componentes de una mezcla, ésta implica un cambio de fase de líquido a gas seguido de una



- Toma de muestras durante la fermentación.
- - - - - Toma de muestra al final de la fermentación.
- ..... Preparación y Análisis de muestras.

Figura 5. Diagrama que muestra las operaciones para la preparación de la muestra de uva Carignane durante el proceso de fermentación.

condensación (The Columbia Electronic Encyclopedia, 2006). Ésta se llevó a cabo colocando en un matraz volumétrico 300 ml de muestra y 300 ml de agua para posteriormente destilar la solución. El tiempo de destilación fue de aproximadamente 25 min.

El destilado se recoge para la toma del grado alcohólico. Éste fue determinado a 20°C por medio de un juego de alcoholímetros calibrados y/o verificados, con escala de % en volumen graduados en alcohol-volumen cuando la temperatura de la muestra era diferente a 20°C se realizó una corrección utilizando tablas.

### **Determinación del Acetaldehído**

Se realizó por medio de cromatografía de gases de acuerdo a la NOM-142-SSA1-1995 en un cromatógrafo de gases HP 5890 series II con columna capilar de carbowax HP de sílica fundida, 0.25 mm de diámetro interno, longitud de 60 metros de largo, con 5,000 platos teóricos. Se utilizó un detector de ionización de flama, nitrógeno como gas acarreador y un estándar interno de 2-Pentanol. La rampa de temperaturas utilizada fue de 34°C por 12.5 min seguido por un incremento de temperatura de 19°C/min hasta llegar a 100°C y se mantienen así por 1 min y finalmente un incremento en la temperatura a una velocidad de 4°C/min hasta llegar a 150°C donde la temperatura fue mantenida por 2 min. Para esta cuantificación se utilizaron las muestras destiladas en la determinación del grado alcohólico.

Por especificaciones de la columna cromatográfica para la determinación de acetaldehído, las destilaciones se comenzaron a realizar cuando el mosto llegó a 4% alcohol-volumen.

### Determinación del Carbamato de Etilo

La determinación de carbamato de etilo se realizó por la técnica modificada propuesta por Herbert y Cols. (2002). Ésta consiste en la detección y cuantificación de carbamato de etilo por medio cromatografía líquida haciendo fluorecer el compuesto con la adición de un reactivo que se une al carbamato de etilo.

El proceso de preparación de las muestras consistió de una centrifugación y filtración con una membrana con poro de 2 nm, esto con el fin que quitar las partículas pequeñas que pueden hacer que aumente la presión de la columna.

Una vez terminado el pretratamiento se prosiguió a preparación para la inyección al equipo cromatográfico. Se tomaron 500  $\mu\text{L}$  de muestra, se le adicionó 100  $\mu\text{L}$  de 9-xantidrol como agente derivatizante, y 50  $\mu\text{L}$  de ácido clorhídrico y se dejaron reaccionar por 5 min en obscuridad (Herbert y Cols., 2002). Una vez obtenida la solución se hizo pasar a través de un acrodisco de 4.5 nm y la muestra filtrada fue inyectada al HPLC.

Se utilizó un equipo de cromatografía líquida ProStar 215 de alta presión con una columna HP Hypersil ODS de 250 mm de longitud y 2.1 mm de diámetro interno. El detector utilizado fue de fluorescencia (HPLC-3) con longitud de onda de excitación 233 nm y longitud de onda de emisión 600 nm, con fases móviles de acetonitrilo y acetato de sodio 0.02 mol/L. La temperatura utilizada fue de 40°C controlada por un horno.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Variación del °Bx Durante el Proceso de Fermentación

Para observar el descenso de la cantidad de azúcares fermentables a través de la fermentación se llevó a cabo la determinación de °Bx de las muestras tomadas durante el proceso de fermentación en cada uno de los tratamientos aplicados a los mostos. En la Figura 6 se observa el comportamiento de esta variable en cada una de las condiciones de tratamiento aplicados de acuerdo al diseño de experimentos. El valor de °Bx observado al inicio de la fermentación fue 17.0 y el máximo fue de 17.8. Esta variación se debió al tiempo de cosecha de la uva, es decir, al tiempo de la vendimia, a medida que pasa más tiempo de maduración el valor del ° Bx es mayor.

Se realizaron ajustes de curvas con los datos obtenidos del °Bx y el tiempo de fermentación para describir matemáticamente el comportamiento de la variación de los °Bx durante la fermentación a las distintas condiciones de temperatura. Para 20°C la regresión que se obtuvo fue:

$$^{\circ} Bx = 18.50 - 0.31t + 0.001t^2$$

donde °Bx representa los Grados Brix, t el tiempo de fermentación. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue de 0.9939. Para 30°C la ecuación que representa la variación de los °Bx fue:

$$^{\circ} Bx = 18.57 - 0.57t + 0.002t^2$$

con  $R^2$  de 0.9758. Para 35°C la regresión obtenida fue:

$$^{\circ} Bx = 17.43 - 0.76t + 0.004t^2$$

con  $R^2$  de 0.9884.

En la Figura 6 se puede observar la disminución de los °Bx por efecto de la temperatura durante el tiempo de fermentación. En ella se observan tres curvas en las cuales el descenso de los °Bx dependió de la temperatura de fermentación

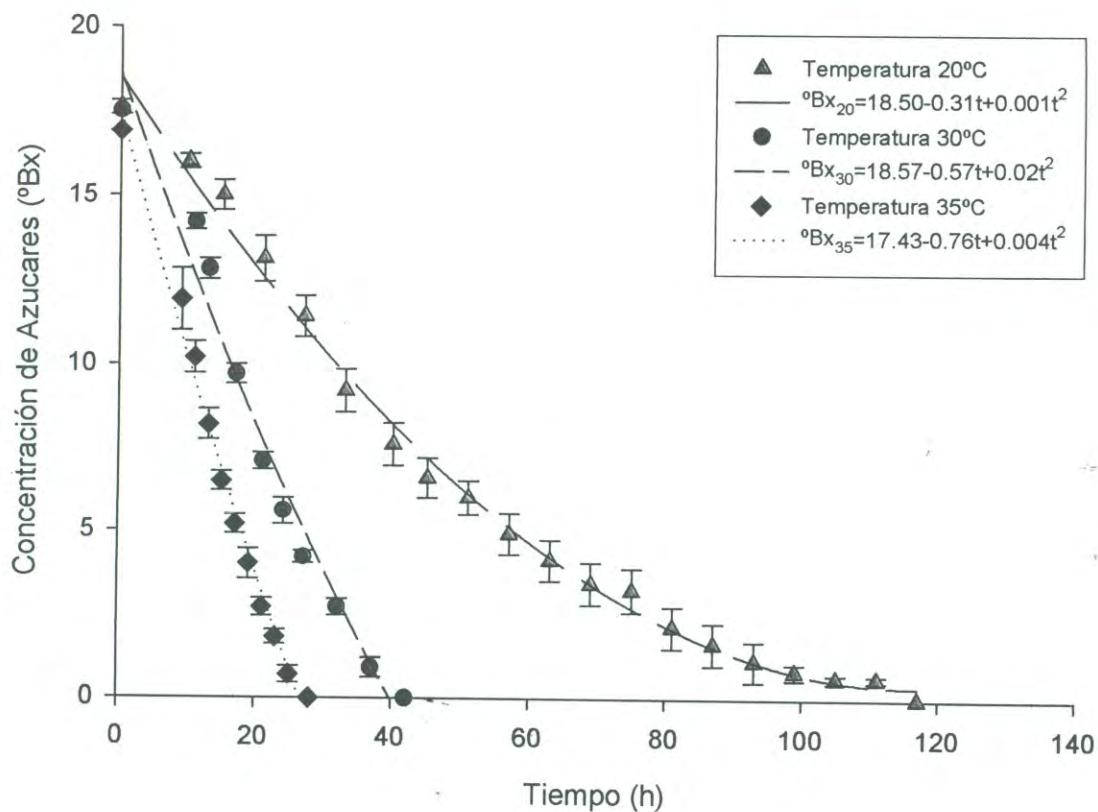


Figura 6. Efecto de la temperatura y el tiempo de fermentación sobre la cantidad de azúcares (expresado en °Bx) durante el proceso de fermentación de mosto de uva Carigñane.



utilizada y se observa claramente el efecto que tiene la temperatura en la velocidad de fermentación. Para 20°C el tiempo de disminución fue menor debido a que la velocidad a la que los azúcares fermentables son convertidos a etanol y CO<sub>2</sub> es más lenta. Para 35°C se obtuvo un menor tiempo que para 30°C y esto debido a que a medida que se aumenta la temperatura se aumenta la velocidad de disminución de los azúcares y el tiempo de fermentación se reduce. Esta disminución se debe a la reproducción y actividad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es decir esta se ve afectada por la temperatura de fermentación. Lo anterior concuerda con Mensonides y Col., (2002) en donde reportaron que la temperatura óptima de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es 37°C y a temperaturas mayores o menores la actividad de la levadura se ve afectada, es por eso que para 30 y 35°C observamos que el tiempo de consumo de los azúcares fermentables es menor debido a que la actividad de la levadura se modificó aumentando su reproducción y actividad.

### Producción de Alcohol durante el Proceso de Fermentación

Para determinar el porcentaje de alcohol-volumen obtenido durante cada una de las fermentaciones se tomaron las muestras y éstas fueron destiladas. Al destilado se le determinó el %Alc. Vol. El valor máximo de %alcohol-volumen observado fue de 9.3 y el mínimo de 8.6, dependiendo de los °Bx iniciales de la uva. El valor de 8.6 se obtuvo al inicio de la vendimia y el valor de 9.3 al final de ésta. En esta determinación también se realizó una regresión para describir de manera matemática el comportamiento durante las fermentaciones de acuerdo a las temperaturas utilizadas. Para 20°C la ecuación se muestra a continuación.

$$\%AV = -0.003 + 0.16t - 0.0007t^2$$

donde AV representa el % Alc. Vol y t el tiempo de fermentación. La R<sup>2</sup> obtenida fue de 0.9993. Para 30°C y 35°C las ecuaciones siguientes representan el comportamiento del %Alc. Vol.

$$\%AV = -0.03 + 0.27t - 0.001t^2$$

$$\%AV = -0.07 + 0.37t - 0.002t^2$$

con  $R^2$  de 0.9986 y 0.9915 respectivamente.

En la Figura 7 se puede observar el comportamiento del %Alc. Vol. en cada una de las temperaturas. A medida que se incrementa la temperatura el tiempo de fermentación transcurre más rápido y la velocidad de generación del etanol es mayor, por lo tanto tarda menos tiempo en llegar a su máximo, esto de nuevo, debido a la reproducción de las levaduras en el proceso de fermentación.

La cantidad de etanol no se vió afectada por la temperatura de fermentación y esto concuerda con el estudio realizadazo por Kourkoutas y Cols, en 2002 donde se realizaron fermentaciones a diferentes temperaturas y la producción de etanol no se vio afectada por las condiciones de temperatura de fermentación.

### **Rendimiento de la Producción de Etanol**

El rendimiento de la producción de etanol es la cantidad de °Bx necesarios para incrementar el 1 % Alc. Vol. en la fermentación. Se realizaron los cálculos de ésta variable de acuerdo a la temperatura de fermentación ya que, de acuerdo a Dharmadhikari (1999), a partir de 1 mol de glucosa se producen 2 moles de etanol y 2 moles de dióxido de carbono.

Teóricamente, la producción de etanol en la fermentación debe ser 51.1% en peso de la glucosa presente de acuerdo a la relación de Gay-Lussac (Zoecklein y Cols., 1990) pero en la práctica es un poco menor, aproximadamente 47 a 48% en peso del azúcar fermentada (Dharmadhikari 1999) por las pérdidas durante la fermentación así como la formación de otros productos por los azúcares disponibles (Zoecklein y Cols., 1990).

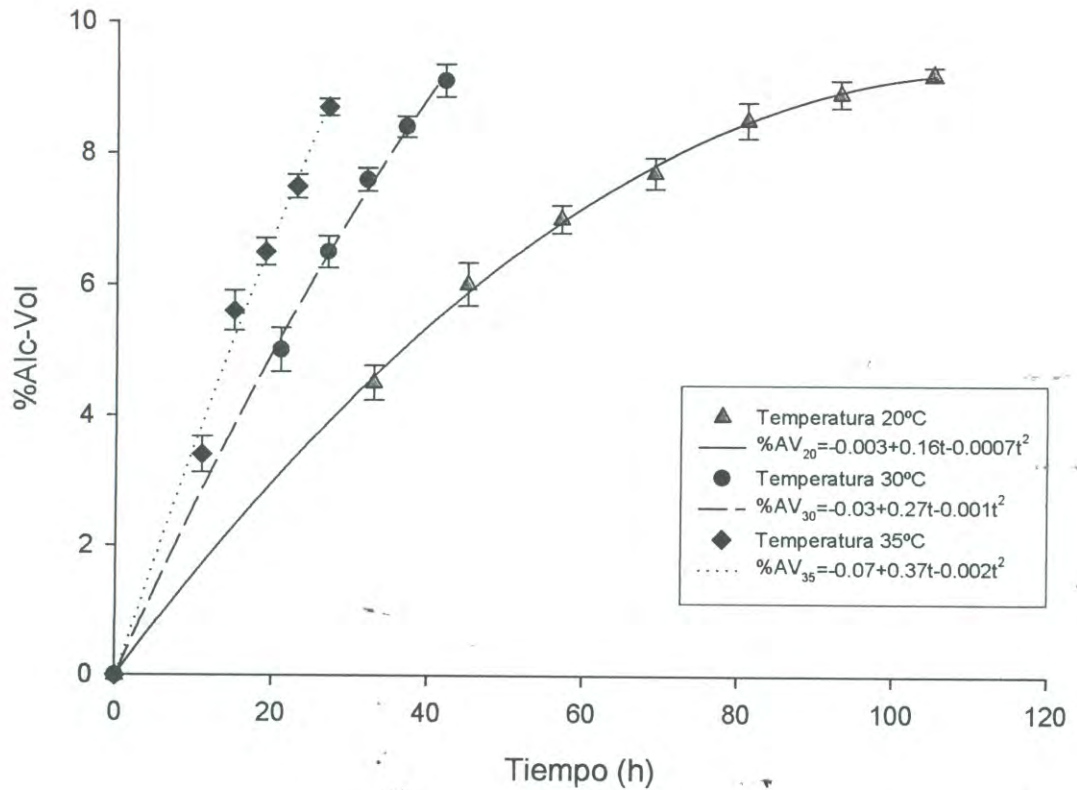


Figura 7. Efecto de la temperatura y el tiempo de fermentación en el contenido de etanol (% Alc. Vol.) durante el proceso de fermentación de mosto de uva Carignane.

Se ha reportado que la producción de etanol por °Bx varía entre las áreas y el año de producción (Jones y Ough, 1985). Sin embargo el Equipo de Viticultura y Enología (Viticulture and Enology Team) de la Universidad Estatal de Washington (WSU) (2004) indica que se puede obtener una ecuación lineal para estimar la cantidad de alcohol que se formará durante el proceso de fermentación.

Se realizaron los cálculos de acuerdo a la temperatura y concentración de enzimas utilizadas para determinar la cantidad de °Bx necesarios para aumentar 1 % Alc. Vol. Los resultados se muestran en la Tabla 8. Se realizó un análisis de comparación de medias de Tukey y no se encontraron diferencias entre los tratamientos; los datos son similares a los manejados por la industria de aproximadamente 1.9°Brix por cada 1% Alc. Vol. Se obtuvo una sola expresión matemática expresada de la siguiente manera:

$$\%AV = -0.0198 + 0.52^\circ Bx$$

donde %AV es el % Alc. Vol., con un coeficiente de determinación de 0.9909

### Acetaldehído

#### **Efecto de la Temperatura de Fermentación y la Concentración de Enzima Pécica sobre la producción de Acetaldehído durante la Fermentación de Mosto de Uva Carignane**

Se realizó un análisis de las curvas para observar la producción de acetaldehído con respecto a cada una de las temperaturas y cada una de las concentraciones de enzima pécica adicionada. En la Figura 8 se observan las tres curvas dependiendo de la temperatura de fermentación utilizada, también se observa las diferencias en los tiempos de fermentación de cada una de las temperaturas que a medida que se aumenta la temperatura la concentración de acetaldehído disminuye.

Tabla 8. Efecto de la temperatura y la concentración de enzima péctica en la producción de etanol por °Bx.

| Temperatura<br>(°C) | Concentración de<br>enzima ( $\mu\text{L}/\text{Kg}$ de uva) | °Brix para producir<br>1% Alc. Vol.* |
|---------------------|--|--------------------------------------|
| 20                  | 0  | $1.9 \pm 0.01^a$                     |
|                     | 9  | $1.9 \pm 0.01^a$                     |
|                     | 18   | $1.9 \pm 0.01^a$                     |
| 30                  | 0  | $1.9 \pm 0.06^a$                     |
|                     | 9  | $1.8 \pm 0.05^a$                     |
|                     | 18   | $1.9 \pm 0.04^a$                     |
| 35                  | 0  | $1.9 \pm 0.03^a$                     |
|                     | 9  | $1.9 \pm 0.02^a$                     |
|                     | 18   | $1.9 \pm 0.03^a$                     |

Comparación de medias de Tukey

Valores con la misma letra en una columna no son diferentes a una  $p < 0.05$ .

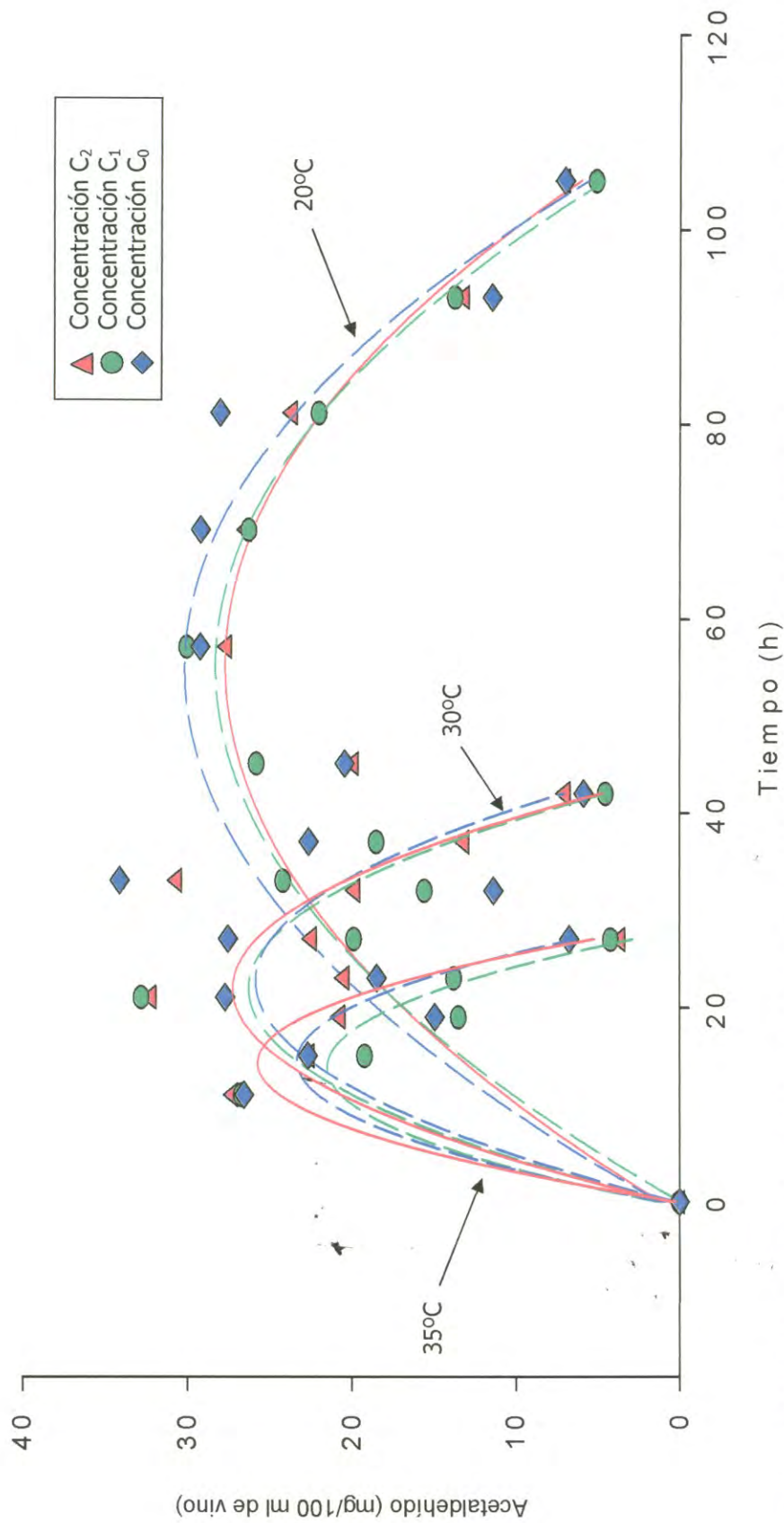


Figura 8. Efecto de cada una de las temperaturas y las concentraciones de enzima péctica sobre la producción de acetaldehído durante el proceso de fermentación de mosto de uva Carigñane.

Observando el cambio de concentración del compuesto con respecto a la temperatura de 20°C tenemos que para C2 la ecuación resultante fue:

$$Acet = 1.18 + 0.96t - 0.008t^2$$

donde Acet representa la concentración de acetaldehído y t el tiempo de fermentación. La  $R^2$  para este ajuste fue de 0.8668. Para la concentración de enzima C<sub>1</sub> la ecuación fue:

$$Acet = -0.03 + 1.03t - 0.009t^2$$

con  $R^2$  de 0.9918. C0 también se representa con una ecuación que a continuación se presenta

$$Acet = 1.18 + 1.06t - 0.009t^2$$

con coeficiente de determinación de 0.8173.

En la Figura 9 se muestra la gráfica en la que se indican las curvas para las tres concentraciones de enzima. Se puede observar cada una de las curvas de concentración de enzima adicionada a la temperatura de 20°C y se aprecia que la variación en las curvas es poca, es por eso que se puede decir que la concentración de acetaldehído no se ve afectada por esta temperatura ni por la concentración de la enzima péctica.

Para la temperatura de 30°C y concentración de enzima péctica C<sub>2</sub> la ecuación que resultó fue:

$$Acet = 0.68 + 2.43t - 0.05t^2$$

con  $R^2$  de 0.9299. Para C<sub>1</sub> el coeficiente de determinación fue 0.8314 con ecuación

$$Acet = 0.75 + 2.33t - 0.05t^2$$

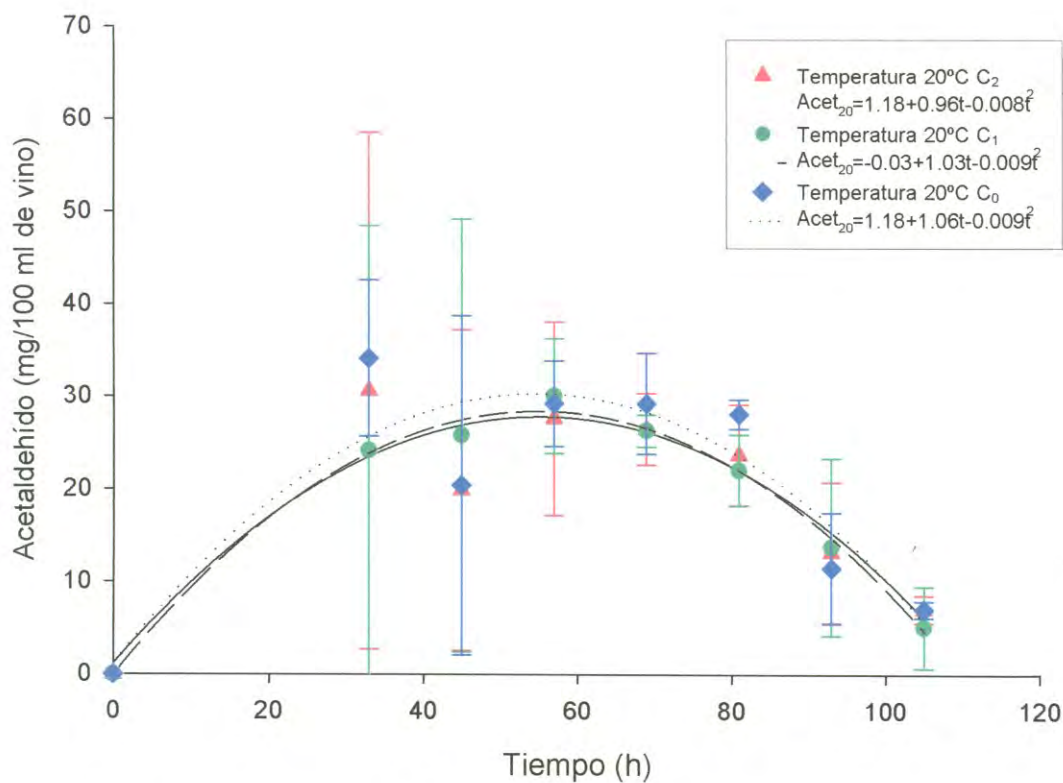


Figura 9. Efecto de la temperatura 20°C y la concentración de enzima pécica sobre la producción de acetaldehído durante el proceso de fermentación de mosto de uva Carignane.



Para la concentración control la ecuación resultante fue:

$$Acet = 0.34 + 2.25t - 0.05t^2$$

Ris. T-932

con coeficiente de determinación de 0.7621.

En la Figura 10 podemos observar el comportamiento para las curvas con temperatura de 30°C y con cada una de las concentraciones de enzima pectica adicionadas. En ella apreciamos como el nivel máximo de acetaldehído es ligeramente menor al máximo nivel obtenido en la gráfica a la temperatura de 20°C. Esta ligera disminución del compuesto se puede deber a la volatilidad que éste presenta, ya que su punto de ebullición es de 21°C y la temperatura utilizada en este caso fue de 30°C, lo que nos indica que el compuesto va desapareciendo en el transcurso de la fermentación.

Para la temperatura de 35°C tenemos que la ecuación resultante para la concentración de pectina C2 fue:

$$Acet = 0.26 + 3.58t - 0.12t^2$$

con un coeficiente de determinación de 0.9290. Para la concentración de enzima C<sub>1</sub> tenemos:

$$\tilde{Acet} = 1.25 + 2.94t - 0.10t^2$$

el coeficiente de determinación fue de 0.8475. La ecuación para C0 se presenta a continuación para la cual se obtuvo una R<sup>2</sup> de 0.8619:

$$Acet = 0.95 + 3.10t - 0.10t^2$$

En la Figura 11 se observan todas las curvas para cada una de las concentraciones de enzima. En esta última gráfica para acetaldehído se observa como el nivel del compuesto es ligeramente menor a las curvas de la temperatura de 30°C, haciéndose la misma observación que se realizó en la temperatura

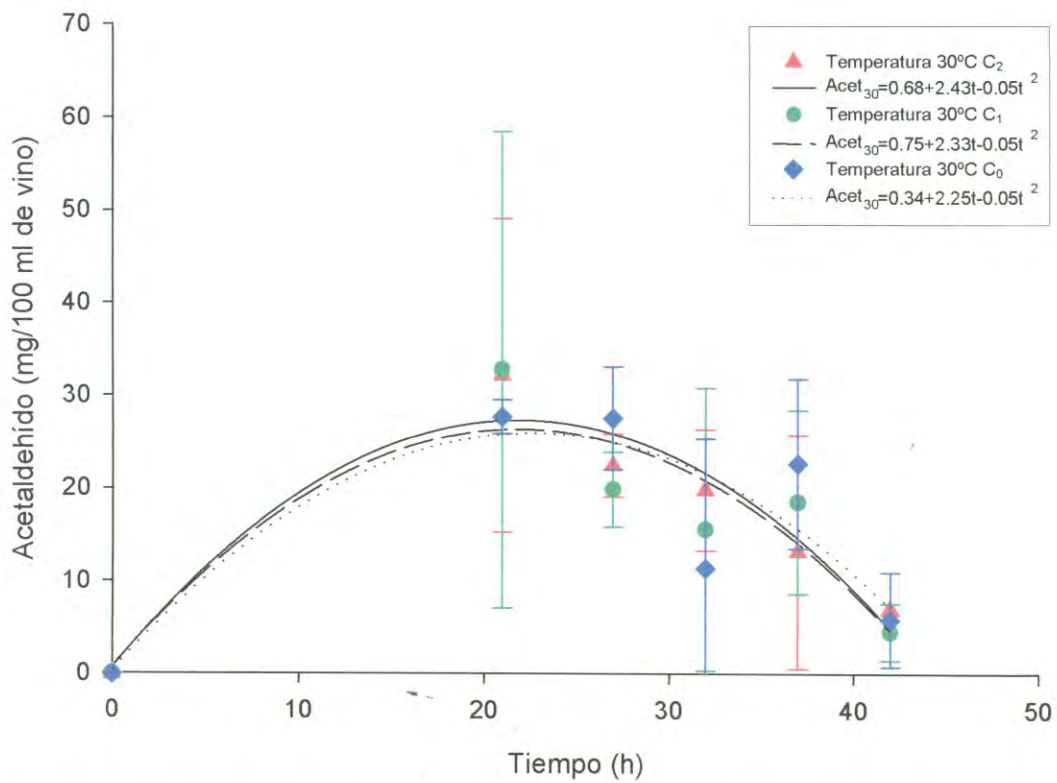


Figura 10. Efecto de la temperatura 30°C y la concentración de enzima pécica sobre la producción de acetaldehído durante el proceso de fermentación de mosto de uva Carignane.

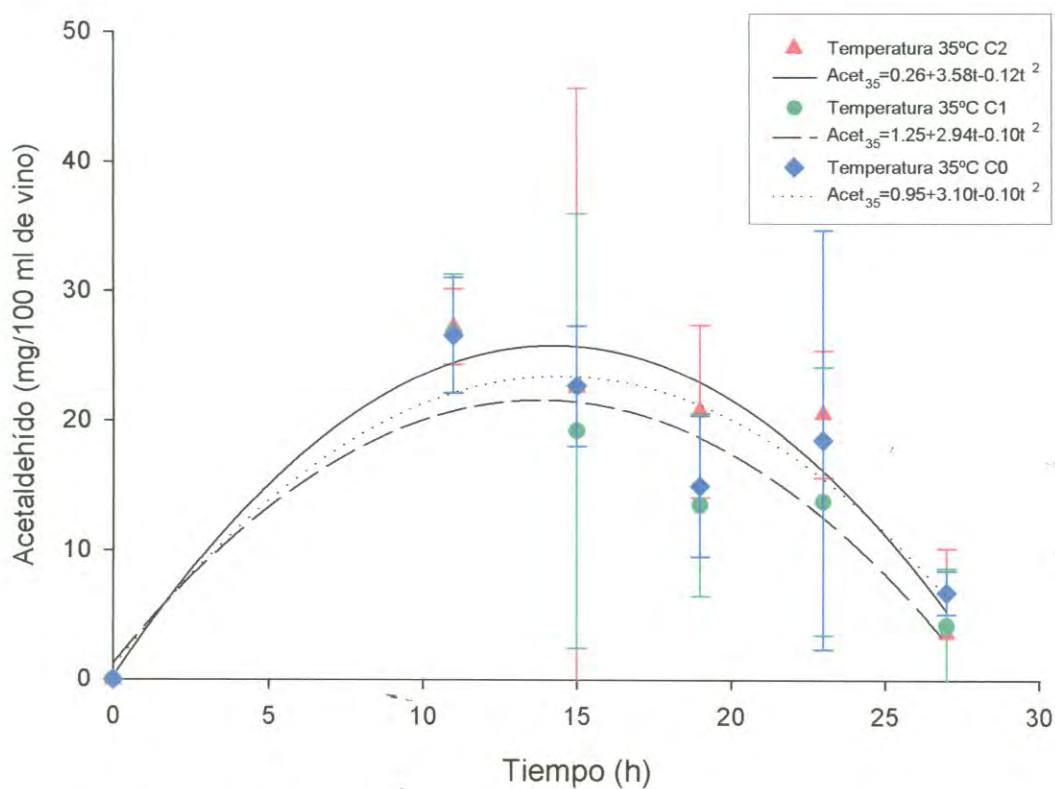


Figura 11. Efecto de la temperatura de 35°C y la concentración de enzima pécica sobre la producción de acetaldehído durante el proceso de fermentación de mosto de uva Carignane.

anterior, el compuesto se ve disminuido ya que se presenta pérdida debido a la mayor volatilidad y a la temperatura de fermentación.

Se realizó el análisis para calcular la cantidad real de acetaldehído en todas las muestras, ya que la respuesta del equipo de cromatografía de gases la da en mg/100 ml de alcohol anhidro, para comparar los resultados obtenidos con los publicados por el trabajo de Lui y Pilone en 2000 donde indican que el nivel máximo permitido del compuesto se encuentra en el rango de 2-212 mg/L, encontrando que ninguna de las muestras se encuentra por arriba de este rango (Tabla 9). Pero de acuerdo a la norma oficial mexicana NMX-V-012-1986, la cual nos indica que el límite máximo permitido es de 40 mg/100 ml de alcohol anhidro, de 178 datos obtenidos 7 resultaron por arriba de este límite, en donde se observa que 4 son para la temperatura de 20°C, 2 para 30°C y 1 para 35°C, indicándonos que la concentración de acetaldehído va disminuyendo de acuerdo al aumento de temperatura debido a su volatilidad.

Se realizó un análisis de medias de Tukey para observar diferencias entre cada tratamiento en cada una de las temperaturas y de acuerdo a los resultados obtenidos no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos.

### Carbamato de Etilo

#### **Validación del Método**

Se prepararon estándares de carbamato de etilo con el propósito de realizar la curva de calibración para la identificación del tiempo de retención y el límite de detección del equipo. Los niveles analizados fueron de 30, 50 y 100 ng/ml (Fig. 12) y se determinó el tiempo de retención del carbamato de etilo a los 10.512 min. El límite de detección fue de 20 ng/ml, es decir, fue el nivel en el cual si se observó pico, sin embargo, no se pudo cuantificar. El límite de cuantificación fue de 30

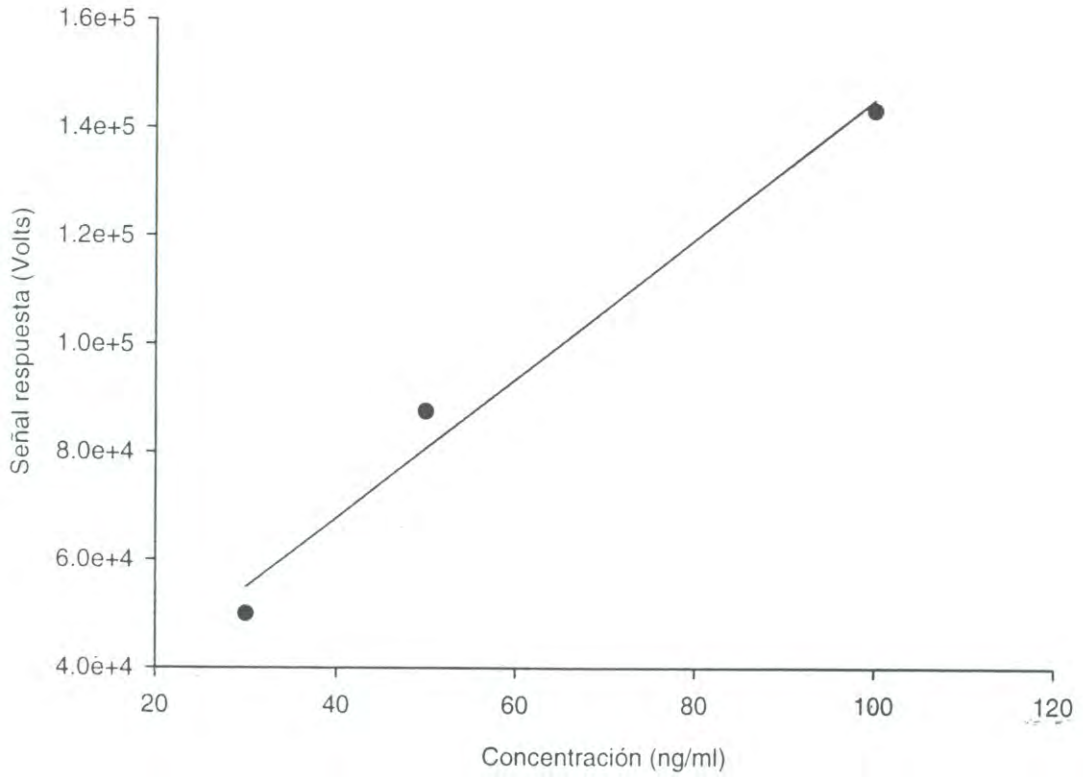


Figura 12. Curva de calibración para la técnica de determinación de carbamato de etilo.

ng/ml, que es el límite máximo recomendado para vinos de uva según la Asociación de Bienestar y Salud de Canadá (Lau y Cols., 1987). Se realizó la curva de calibración y se obtuvo un ajuste a una línea recta con una  $R^2$  de 0.990388. En la Figura 13 podemos observar el cromatograma que muestra el tiempo de retención del carbamato de etilo y en la Figura 14 se presenta el cromatograma de cerca en donde se observan los picos para cada uno de los niveles utilizados en la curva de calibración

También se realizaron pruebas para determinar la eficiencia de la reacción de derivatización. Se contaminaron muestras con carbamato de etilo en las cuales inicialmente estaba ausente el compuesto, a concentraciones conocidas y se obtuvo un porcentaje de recuperación de 101% lo que concuerda con estudios realizados por Herbert y Cols. (2002).

### **Presencia del Carbamato de Etilo durante el Proceso de Fermentación**

De acuerdo a la metodología utilizada (Herbert y Cols., 2002) no se detectó carbamato de etilo en ninguna de las muestras analizadas. En la Figura 15 se presenta el cromatograma en donde observamos el tiempo de retención del compuesto y en la Figura 16 podemos observar que no hay presencia de pico de carbamato de etilo para la muestra en análisis.

Debido a su importancia toxicológica, el carbamato de etilo se ha analizado en vinos de Estados Unidos de América (VEU) y de importación (VI) a ese país. Bluhm (1998) realizó el estudio en el cual encuentra que de 114 muestras analizadas para VEU, no detecta ninguna para un nivel mayor de 30 ng/ml (nivel 1) de carbamato de etilo, 2 de ellas presentan un valor dentro de 20-30 ng/ml (nivel 2), y para menos de 20 ng/ml (nivel 3) un porcentaje de 1.75% de las muestras se encuentran en este rango. En el caso de VI de 25 muestras analizadas, 4 de ellas estuvieron dentro del nivel 1, 1 en el nivel 2 y 20% de las muestras se encontró en el nivel 3. Lo anterior nos indica que el carbamato de

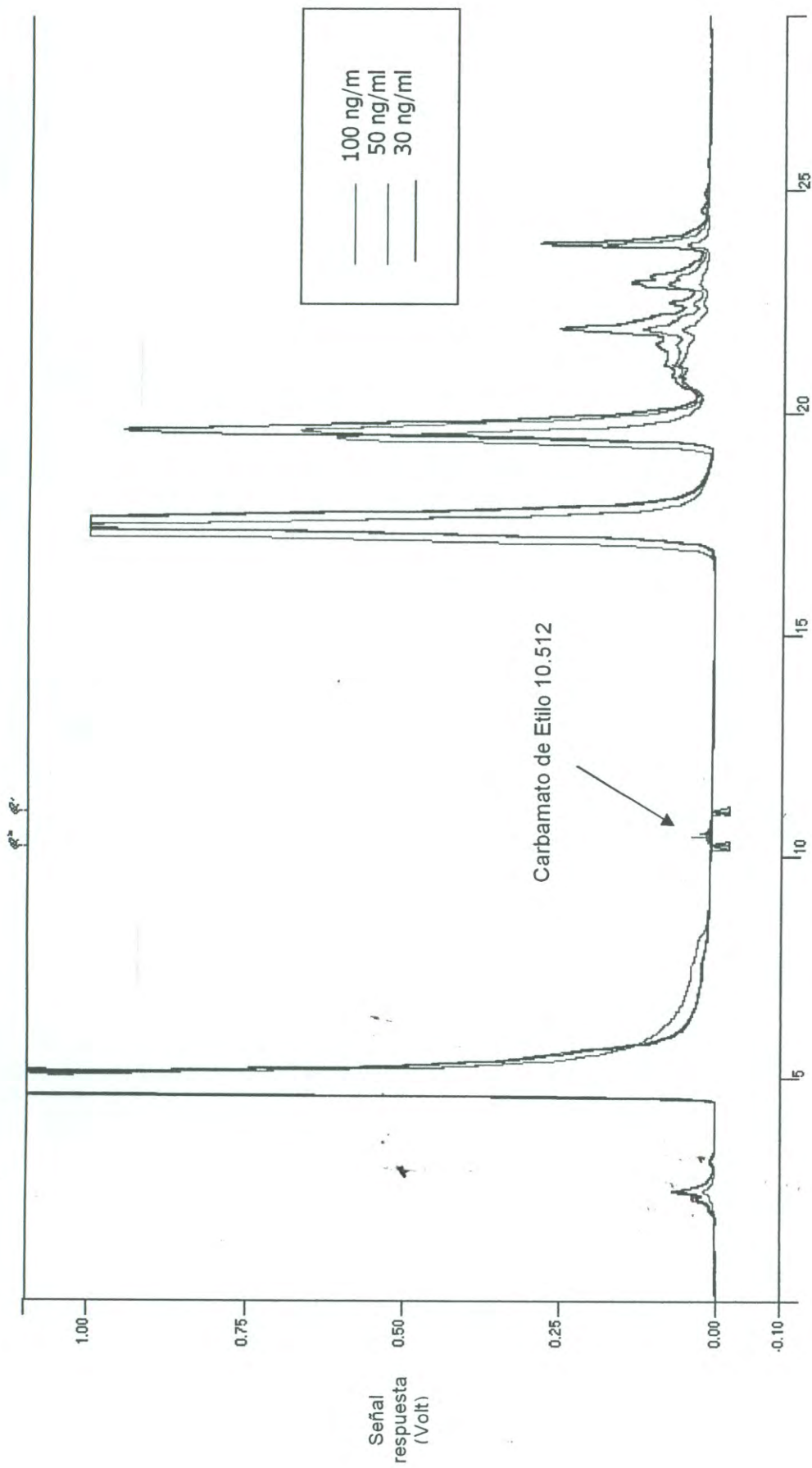


Figura 13. Tiempo de retención en estándares de carbamato de etilo en cromatografía líquida.

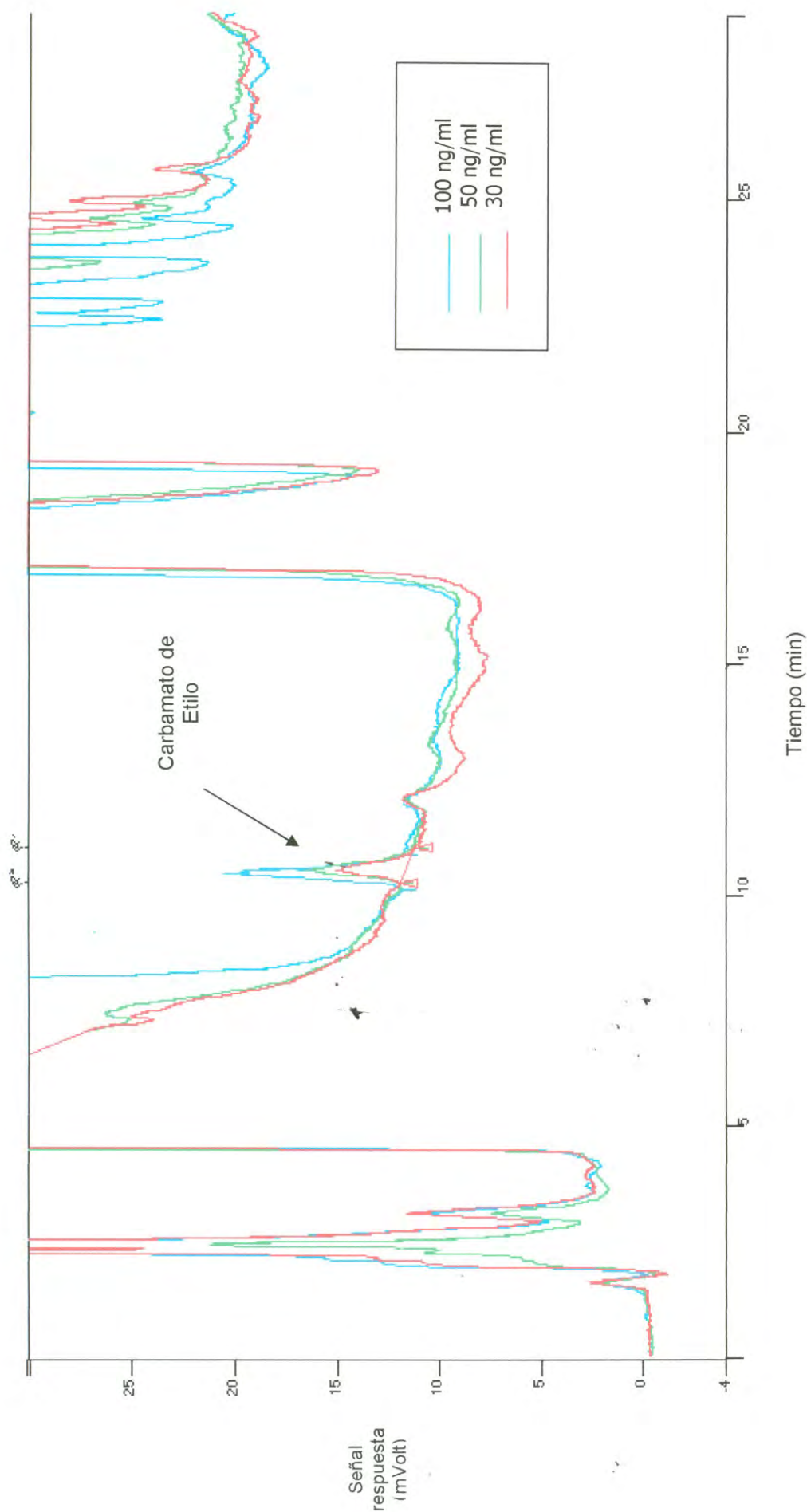


Figura 14. Cromatograma ampliado de tamaño para resaltar el pico de carbamato de etilo en estándares utilizados en cromatografía líquida.



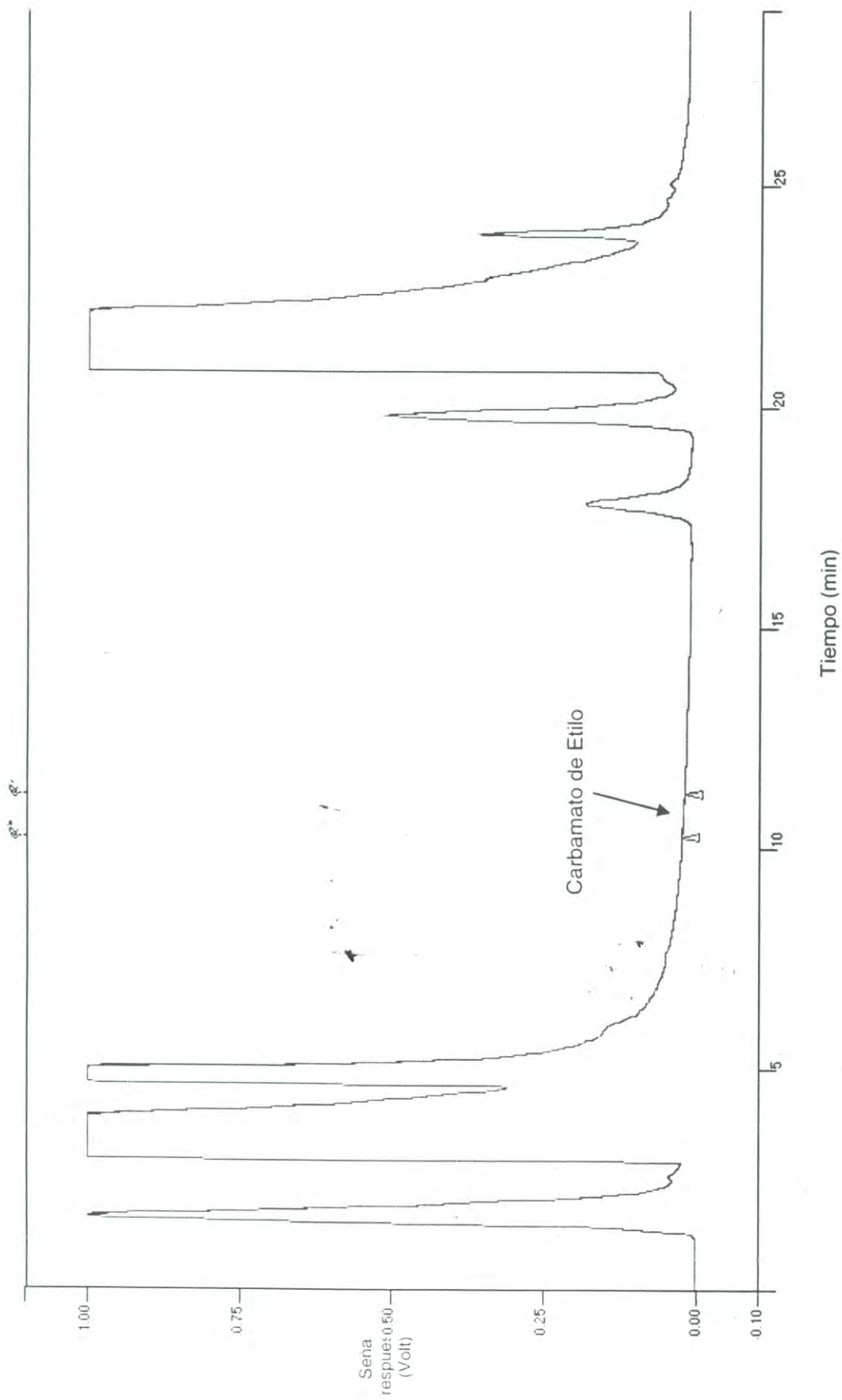


Figura 15. Cromatograma que indica el tiempo de retención para carbamato de etilo para muestras tomadas durante el proceso de fermentación.

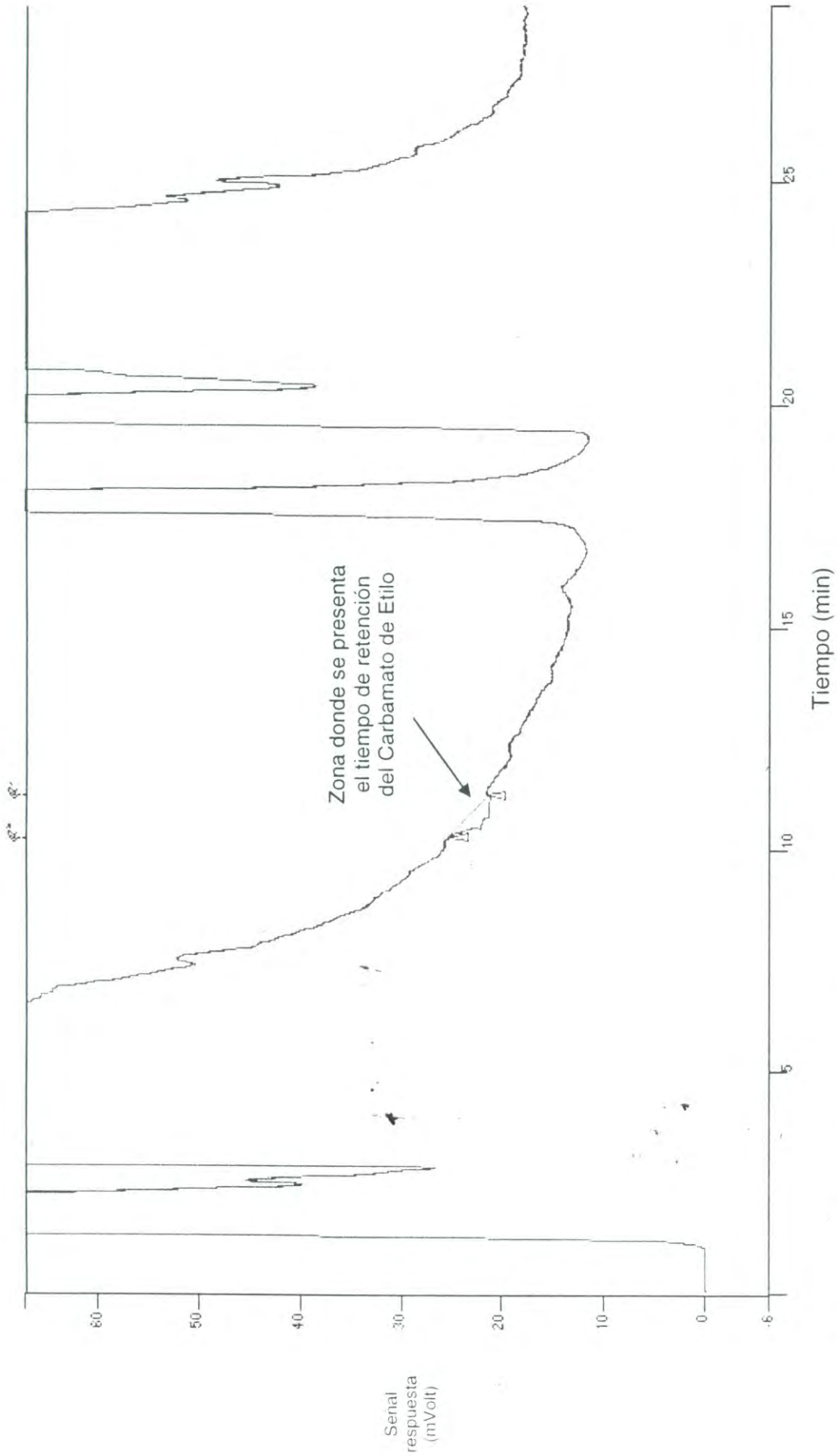


Figura 16. Cromatograma que indica que no hay presencia de carbamato de etilo en muestras tomas durante el proceso de fermentación.

etilo en vinos se encuentra por debajo del nivel establecido como máximo permitido por Canadá, por lo que lo hace libre de ese tóxico.

### **Presencia del Carbamato de Etilo en Muestras Adicionadas con Urea**

Se realizó una fermentación a 30°C en una incubadora adicionando 0.2 gr/L de urea al mosto de uva Carignane, esta cantidad se agregó de acuerdo a lo que indica Kodama en 1994 en donde publica que esta cantidad es la máxima permitida de urea en mosto de uva para que no se presente carbamato de etilo en vinos, es por eso que se adicionó esta cantidad, para evaluar si la adición de urea promovía la presencia del compuesto en el producto final.

Se analizaron las muestras adicionadas con urea en el cromatógrafo de líquidos de acuerdo a la metodología descrita (Herbert y Cols., 2002) y no se detectó presencia de carbamato de etilo en las muestras (Fig. 17). En la Figura 17 se observa el cromatograma de cerca que indica la señal que el detector proporcionó para el análisis de la muestra de mosto adicionada con urea. En ella se observa el tiempo de retención y no se detecta el pico del compuesto, indicando que efectivamente no hay presencia de carbamato de etilo en el vino a las condiciones de urea adicionadas, de donde se deduce que esto se puede deber a que las levaduras se desarrollaron tan rápidamente, ya que la temperatura de fermentación fue de 30°C, que no dieron tiempo a que la arginina fuera degradada por las bacterias para producir citrulina para, posteriormente, producir carbamato de etilo, o que simplemente la urea no fue suficiente para que la arginina produjera el compuesto.

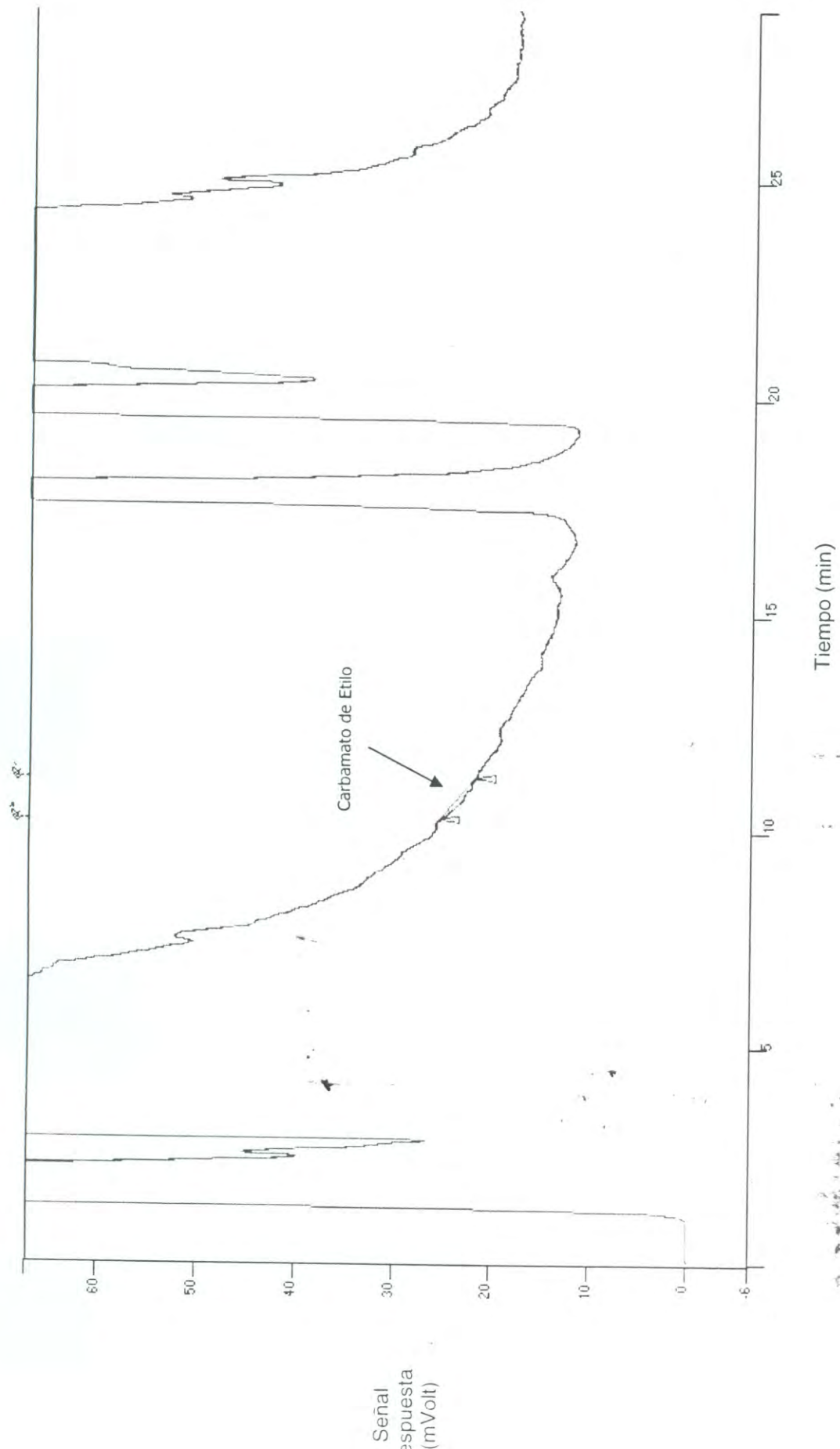


Figura 17. Cromatograma que indica que no hay presencia de carbamato de etilo en muestras fermentadas con urea. 2

## CONCLUSIONES

1. La reducción de los °Bx en las temperaturas de 20, 30 y 35°C se ve afectada por la temperatura, ya que a medida que se aumenta, se acelera la fermentación y el nivel de °Bx es disminuido más rápidamente. La concentración de enzima péctica adicionada no afecta los °Bx, ya que al nivel de azúcar no le afecta si se aumenta o se disminuye el contenido celular del fruto, el consumo de la glucosa por la levadura para la producción de etanol será la misma.
2. El rendimiento de la producción de etanol en relación a los °Bx no se ve afectado por las temperaturas ni por la concentración de enzimas pécticas, ya que la cantidad de azúcar que es fermentada por los microorganismos no depende de estas condiciones. Sin embargo la velocidad de producción de etanol si se ve afectada por las temperaturas utilizadas.
3. La concentración de acetaldehído es afectada por el aumento de la temperatura ya que a medida que se incrementó, el compuesto disminuyó, es decir, se volatilizó debido a su temperatura de ebullición. La disminución no fue significativa en las temperaturas de 30 y 35°C ya que entre ellas existe una diferencia menor con respecto a la temperatura de 20°C, es por lo anterior, que en las temperaturas más altas no se observa esa diferencia de la disminución del compuesto.
4. Con respecto a las concentraciones de enzimas, no se observan diferencias significativas en relación a cada una de las temperaturas utilizadas (35, 30 y 20°C), es decir, la concentración de acetaldehído no se ve afectada con la temperatura ni por las concentraciones de enzima péctica durante el proceso de fermentación.

5. Bajo las condiciones planteadas por el diseño experimental, la mayoría los datos obtenidos para acetaldehído se encuentran por debajo del límite máximo permitido publicado por Liu y Pilone en 2000, por lo tanto no existe riesgo para el consumidor el ingerir estos vinos.
6. No se presentó carbamato de etilo en ninguna de las muestras de mostos y vinos analizados, de acuerdo a las condiciones de temperatura y concentración de enzima adicionadas, a pesar de que teóricamente se reporta que su presencia es probable con el aumento de temperatura en este estudio no hubo presencia del compuesto.
7. Es probable que en las muestras adicionadas con urea, esta no haya sido suficiente para que la levadura o bacterias presentes degradaran la arginina para formar citrulina y esta a su vez producir carbamato de etilo.
8. Bajo las condiciones planteadas del estudio no hay presencia de carbamato de etilo en las muestras analizadas es por eso que no representan riesgo para el consumidor.

## RECOMENDACIONES

1. Este estudio constituye la primera investigación sobre la presencia de carbamato de etilo y acetaldehído en el proceso de fermentación de uva de Sonora. Se recomienda realizar más estudios ya que como se observó en esta investigación es muy importante la prevención de la aparición de estos compuestos, que son tóxicos en el vino y pueden causar daño al consumidor.
2. Realizar un estudio con diferentes especies de levaduras del género *Saccharomices* bajo las condiciones sugeridas por este estudio, ya que otro tipo de levaduras también puede influir en la producción del acetaldehído. Aunque existen estudios que indican que utilizar otro tipo de levadura no es conveniente.
3. Estudiar como se lleva a cabo la formación de acetal en las condiciones de este estudio, ya que este compuesto es el que se forma cuando se desdobra el acetaldehído, y que también es considerado como tóxico para el ser humano.
4. Emplear concentraciones de urea por arriba de 2 mg/L para observar como es la producción del carbamato de etilo en el proceso de fermentación ya que en este estudio solo se empleo esta cantidad y con otras concentraciones se pudiera determinar en cual de ellas el compuesto se genera o es más estable en el proceso de fermentación.

## REFERENCIAS

- Allen, J.W., Stoner, G.D., Pereira, M.A., Backer, L.C., Sharief, Y., Hatch, G.G., Campbell, J.A., Stead, A.G., and Nesnow, S. (1986). Tumorigenesis and genotoxicity of ethyl carbamate and vinyl carbamate in rodent cells. *Cancer Research* 46:4911-4915.
- Almy, J., and Ought, C.S. (1996). Urea analysis for wines. Office International de la Vigne et du Vin F.V. 1031 2343/120296.
- Amerine, M., and Ough, C. (1976). Análisis de vinos y mostos. Ed. Acribia. Zaragoza, España. Pp. 78-79.
- Arctander, S. (1969). Perfume and flavor chemicals; published by the author: Montclair, NJ.
- ASERCA. (2002). De nuestra cosecha: los titanes del desierto. Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (ASERCA). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Claridades Agropecuarias: La Vid y la Uva. Mayo 105:3-30. Página de Internet: <http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/>.
- Azevedo, Z., Couto, J.A., and Hogg, T. (2002). Citrulline as the main precursor of ethyl carbamate in model fortified wines inoculated with *Lactobacillus higaridi*: a marker of the levels in a spoiled fortified wine. *Letters in Applied Microbiology* 34:32-36.
- Bailey, R., North, D., and Myatt, D. (1986). Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages by methylation and gas chromatography with nitrogen-phosphorus thermionic detection. *Journal of Chromatography* 369:199-202.
- Bakoyianis, V., Kanellaki, M., Kourtinas, A.A., Agelopoulos, K. (1997). Comparative study of kissiris,  $\gamma$ -alumina and Ca-alginate as supports of cells for batch and continuous wine making at low temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:4884-4888.



- Bardi, E., and Koutinas, A.A. (1994). Immobilization of yeast on delignified cellulosic material for room temperature and low-temperature winemaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42:221-226.
- Battaglia, R., Conacher, H.B.S., and Page B.D. (1990). Ethyl carbamate (urethane) in alcoholic beverages and foods: a review. *Food Additives and Contaminants* 7:477-496.
- Bayer, E. (1966). Quality and flavor by gas chromatography. *Journal of Gas Chromatography* 4:67-73.
- Beech, F.W. (1993). Yeast in cider-making. In *The Yeast 5: Yeast Technology*; Rose, A.H., Harrison, J.S., Eds.; Academic Press: London, U.K. Pp. 169-214.
- Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozes, N., Mas, A., and Guillamón, M. (2005). Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:996-1002.
- Bennetzen, J., and Hall, B.D. (1982). The primary structure of *S. cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase I. *Journal of Biological Chemistry* 257:3018-3025.
- Butzke, C.E., and Bisson, L.F. (1997). Ethyl carbamate: preventive action manual. Office International de la Vigne Et Du Vin. Feuillet bleu N°54 S.A. 2547/100398.
- Boletín Ciencia Vino y Salud (2000). Daño oxidativo al material genético. frutas, verduras y vino protegen al ADN de daño oxidativo inductor de cáncer. 4(1).
- Cairns, T., Siegmund, E.G., Luke, M.A., and Doose, G.M. (1987). Residue levels of ethyl carbamate in wines and spirits by gas chromatography and mass spectrometry/mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 59:2055-2059.
- Cabaroglu, T. (2005). Methanol contents of Turkish varietal wines and effect of processing. *Food Control* 16:177-178.
- De la Llana, H. (1980). Manual práctico de vinificación y conservación de los vinos. Tercera ed. Ed. Acribia. Zaragoza, España. Pp. 24-30.

- De la Torre, M., y Buxaderas, S. (2004) El carbamato de etilo, situación problema. Área de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. Página de Internet: [http://www.rubes.es/ace\\_anterior/arxiu-c/1c39/ciencia-c.htm](http://www.rubes.es/ace_anterior/arxiu-c/1c39/ciencia-c.htm)
- Delanoe, D., Maillard, C., y Maisondieu, D. (1988). El vino del analista a la elaboración. Ed Hemisferio Sur S.<sup>67</sup> Montevideo, Uruguay. Pp. 13.
- Dharmadhikari, M. (1999). Small-scale white wine production (part 4). *Vineyard and Vintage View* 14(5):1-3
- Delfini, C., and Formica, J. (2001). *Wine Microbiology: science & technology*. L'artistica Sauigliano. Italy.
- Escudero, A., Asensio, E., Cacho, J., and Ferreira, V. (2002). Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. *Food Chemistry* 77:325-331.
- Ferrari, G. (2002). Influence of must nitrogen composition and defects - A review. *Journal International Des Science De La Vigne Et Du Vin* 36(1):1-10.
- Ferreira, V., Culleré, L., López, R., and Cacho, J. (2004). Determination of important odor-active aldehydes of wine through gas chromatography-mass spectrometry of their O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl) oximes formed directly in the solid phase extraction cartridge used for selective isolation. *Journal of Chromatography A* 102: 339-345.
- Herbert, P., Santos, L., Bastos, M., and Barros, P. (2002). New HPLC method to determine ethyl carbamate in alcoholic beverages using fluorescence detection. *Journal of Food Science* 67(5):1616-1620.
- Herrero, M., García, L.A., and Díaz, M. (2003). The effect of SO<sub>2</sub> on the production of ethanol, acetaldehyde, organic acids, and flavor volatiles during industrial cider fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:3455-3459.
- IARC (1974). Urethane. 7:111.
- IARC (1988). Alcohol Drinking. 35:44.
- IARC (1999). Acetaldehyde. 71:319.

- Jackson, S.R. (1994). Fermentation. In Wine Science. Principles and Applications; Academic Press: San Diego, CA. Pp. 220-272.
- Joe, F.L., Kline, D.A., Miletta, E.M., Roach, J.A.G., Roseboro, E.L., Fazio, T. (1977). Determination of urethane in wine by gas-liquid chromatography and its confirmation by mass spectrometry. Journal of Association of Analytical Chemistry 60:509-516.
- Karklīnya, D.Ya., and Liyelpetere, A.Ya. (1985). Dispersion analysis of productivity of different yeast strains. Izv. Akad. Nauk latv. SSR 11:84-86.
- Kodama, S., Suzuki, T., Fujinawa, S., De La Teja, P., and Yotsuzuka, F. (1994). Urea contribution to ethyl carbamate formation in commercial wines during storage. American Journal of Enology and Viticulture 45(1):17-24.
- Kourkoutas, Y., Koutinas, A. A., Kanellaki, M., Banat, I. M., and Marchant, R. (2002). Continuous wine fermentation using a psychrophilic yeast immobilized on apple cuts at different temperatures. Food Microbiology 19:127-134.
- Lau, B., Weber, D., and Denis, P. (1987). Gas chromatographic-mass spectrometric determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages. Journal of Chromatography 402: 233-241.
- Liu S.Q. y Pilone, G.J., (2000), An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications, International Journal of Food Science and Technology, 35:49-61. Internet Page: <http://waterhouse.ucdavis.edu/winecomp/acetaldehyde.htm>
- Liu, S.Q., Pritchard, G.G., Hardman, M.J., and Pilone, G.J. (1994). Citrulline production and ethyl carbamate (urethane) precursor formation from arginine degradation by wine lactic acid bacteria *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus buchneri*. American Journal of Enology and Viticulture 45:235-242.
- López, C.M. (2006). Estudio de la generación de metanol y la presencia de ocratoxina A durante el proceso de elaboración de vino con uvas (*Vitis vinifera*) Carignane de Sonora. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. Pp. 14.

- Maarse, H., and Vischer, C.A. (1989). Volatile compounds in food. Alcoholic Beverages. Qualitative and Quantitative Data, TNO-CIVO, Food Analysis Institute, AJ Zeist, The Netherlands.
- McGill, D.J., and Morley, A.S. (1990). Ethyl carbamate formation in grain based spirits: IV. Radiochemical studies. *Journal of Institute of Brewing* 96:245-246.
- Mallouchos, A., Skandamis, P., Loukatos, P., Komaitis, M., Koutinas, A., and Kanellaki, M. (2003). Volatile compounds of wines produced by cells immobilized on grape skins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3060-3066.
- Mesa, J.J., Infante, J.J., García, E., Muñoz, M.G., Rodríguez, M.E., Deben, F.J., Rebordinos, L., y Cantoral, J.M. (1999). Crianza biológica dirigida mediante cultivos de cepas seleccionadas. *Jornadas Científicas 99 Grupos de Investigación Enológica. Sistemas de Envejecimiento y Crianza*. Zaragoza. Pp. 7-8. Página de Internet: [http://www.acenologia.com/ace\\_anterior/pdf/crianza.pdf](http://www.acenologia.com/ace_anterior/pdf/crianza.pdf)
- Miller, B., and Litsky, W. (1976). *Industrial Microbiology*. Ed. Mc. Graw-Hill.
- Mira de Orduña, R., Liu, S.Q., Patchett, M.L. and Pilone, G.J. (2000). Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 183:31-35.
- Mirvish, S.S. (1968). The carcinogenic action and metabolism of urethane and N-hydroxyurethane. *Advances in Cancer Research* 11:1-42.
- Miyake, T., and Shibamoto, T. (1993). Quantitative analysis of acetaldehyde in foods and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41:1968-1970.
- Monteiro, F.F., Trousdale, E., and Bisson, L.F. (1989). Ethyl carbamate formation in wine: use of radioactively labeled precursor to demonstrate the involvement of urea. *American Journal of Enology and Viticulture* 40:1-8.
- Morassut, M., and Cecchini, F. (1999). Reduction of ethyl carbamate in wine & HACCP application. *Industries Delle Bevande* 28(162):377-382.
- Norma Oficial Mexicana NOM-142-SSA1-1995 (3 de junio de 1996).

- Nykanen, L. (1986). Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *American Journal of Enology and Viticulture* 37:84-96.
- Nykanen, L., and Soumalainen, H. (1983). Formation of aroma compounds by yeast. In *Aroma of Beer, Wine and Distilled Alcoholic Beverages*; Reídle Publishing: Dordrencht, The Netherlands. Pp. 3-15.
- Oreglia, F. (1978). *Enología teórico-práctica*, 2da. Ed., Ediciones Instituto Salesiano de Artes Gráficas, Buenos Aires, Argentina.
- Ough, C.S. (1976). *Journal Agricultural and Food Chemistry* 24:323, 328.
- Ough, C.S. (1992). *Fermentación y composición del vino. Tratado de Enología*. Ed. Acribia, España.
- Ough, C.S., Crowell, E.A., & Mooney, L.A. (1988). Formation of ethyl carbamate precursors during grape juice (Chardonnay) fermentation. I. Addition of amino acids, urea, and ammonia: Effects of fortification on intracellular and extracellular precursors. *American Journal of Enology and Viticulture* 3(39): 243-249.
- Ough, C.S., Stevens, D., Sendovski, Z., Hwang, Z., and An, D. (1990). Factors contributing to urea formation in commercially fermented wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 41:68-73.
- Paltrinieri, G. y Figuerola, F.Z. (1993). *Manual para el curso sobre procesamiento de frutas y hortalizas a pequeñas escala en Perú. Seminario subregional y curso para el desarrollo de microempresas agroindustriales rurales y talleres itinerantes sobre procesamiento de frutas y hortalizas*. Lima, Peru. Página de Internet:  
<http://www.fao.org/docrep/x5063S/x5063S00.htm#Contents>
- Pereira, M.A., Khoury, M.M., Glauert, H.P., and Davis, R.A. (1991). Screen of five alkyl carbamates for initiating and promoting activity in rat liver. *Cancer Letters* 57:37-44.
- Prescott, and Dunn (1982). *Industrial microbiology*. Fourth edition, U.S.A. Avi Publishing.

- Quiñones, O.D. (2005). Identificación de los compuestos fenólicos de la cáscara y semilla de la uva carignane. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. Pp. 64.
- Rapp, A., and Mandery, H. (1986). Wine aroma. *Experientia* 42:873-884.
- Rojas, V., Gil, J.V., Piñaga, F., and Manzanares, P. (2003). Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 86:181-188.
- Romano, P., Suzzi, G., Turbanti, L., and Polsinelli, M. (1994). Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters* 118:213-218.
- Sánchez, C. (2002). Intoxicación por alcohol metílico. Página de Internet: <http://www.aibarra.org>
- Saucier, C., Bourgeois, G., Vitro, C., Roux, D., and Glories, Y. (1997). Characterization of (+)-catechin-acetaldehyde polymers: a model for colloidal state of wine polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:1045-1049.
- Schlatter, J., and Lutz, W. (1990). The carcinogenic potential of ethyl carbamate (urethane): risk assessment at human dietary exposure levels. *Journal of Food Chemistry and Toxicology* 28(3):205-211.
- Schreier, P. (1979). Flavor composition of wines: a review. *CRC Crit. Rev. Food Science of Nutrition* 12:59-111.
- Sen, N.P., Seaman, S.W., and Weber, D. (1992). A method for the determination of methyl carbamate and ethyl carbamate in wines. *Food Additives and Contaminants* 9:149-160.
- Suzuki, K., Kamimura, H., Ibe, A., Tabata, S., Yasuda, K., and Nishijima, M. (2001). Formation of ethyl carbamate in umeshi (plum liqueur). *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 42(6):354-358.
- Tatken, R.L., and Lewis, R.L. (1981). *Registry of Toxic Effects of Chemicals Substances* 1:829.

- Tegmo-Larsson, I.M., and Henick-Kling, T. (1990). Ethyl carbamate precursors in grape juice and the efficiency of acid urease on their removal. *American Journal of Enology and Viticulture* 41(3):189-192.
- Teixeira, J., E. do V. (1940). O etanal no vinho do porto. *Anais. Inst. Vinho Porto* 1:295-303.
- The Columbia Electronic Encyclopedia. (2006). 6th ed. Columbia University Press. Internet Page: <http://www.infoplease.com/ce6/sci/A0815646.html>
- Vine, R. (2002). *Winemaking. From grape growing to market place.* Kluwer academic/Plenum publishers. USA.
- Viticulture and Enology Team (2004). Better winemaking through biochemistry: Episode 1, sugars. *WSU Wine and Grape Research and Extension Newsletter* 14(2):10-13.
- Vogt, J., and Lemperle, W. (1984). *El vino.* Ed. Acribia, España.
- Waterhouse, (2006). Acetaldehyde. Internet Page: <http://waterhouse.ucdavis.edu/winecomp/acetaldehyde.htm>.
- Wildenradt, H. L. and Singleton, V.L. (1974). The production of aldehydes as a result of oxidation of phenolic compounds and its relation to wine ageing. *American Journal of Enology and Viticulture* 25(2):119-126.
- Winter, M. (2002). Etil carbamate research. *Wine business monthly.* Internet Page: <http://www.winebusiness.com/html/MonthlyArticle.cfm?aid=53982&issueid=53965>.
- Woo, I-S., Kim, I-H., Yun, U-J., Chung, S-K., Rhee, I-K., Choi, S-W., and Park, H-D. (2001). An improved method for determination of ethyl carbamate in Korean traditional rice wine. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26: 363-368.
- Wucherpfenning, K. and Semmeler, G. (1972). Acetalde-hydbildung im verlauf der garung in abhangigkeit vom wuchsstoffgehalt des garsubstrates. I. Milleilung. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* 148:77-82.
- Ya-Ping, M., Fu-Quan, D., Dai-Zhou, C., and Shou-Wei, S. (1995). Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages by capillary multi-dimensional

gas chromatography with thermionic specific detection. *Journal of Chromatography A* 695: 259-265.

Yajima, M., and Yokotsuka, K. (2001). Volatile compounds formation in white wines fermented using immobilized and free yeast. *American Journal of Enology and Viticulture* 52:210-218.

Zimmerli, B., and Schalatter, J. (1991). Ethyl carbamate: analytical assessment. *Mutat. Res.* 259:325-350.

Zoecklein, B., Fuegelsang, K., Gump, B., and Nury, F. (1990). *Production wine analysis*. An Avi Book. USA.