

Contribución a la diferenciación de los Vinos de algunas comarcas españolas

por

Vicente Serrano Brú

Ars Pharm. VIII, 7-10 (1937)

Son muchas las consideraciones en un estudio sobre los vinos, ya sea la energética, la de aporte cualitativo de principios fundamentales, el aspecto coadyuvante en la digestión de estos principios por el alcohol (1) o la investigación de sus posibles fraudes, entre otras.

Se citan trabajos con orientación variada, como son sus acciones colerética y colagoga (1) y hasta bactericida para los tintos (2).

La legislación en los vinos tiende, como en los restantes alimentos, a conseguir, de una parte, la bondad en el producto, y de otra, a que el analista tenga seguridad en los resultados, por una acertada selección de los métodos analíticos en uso; pero las cifras de resultados normales que la legislación da en las materias alimenticias, son siempre de un margen amplio y frecuentemente se concretan en un mínimo o en un máximo.

La identificación de su origen está basada en la coincidencia del conjunto de sus características, con las establecidas como propias de las de una zona.

Como consecuencia de todo ello, un vino puede atenerse a estas condiciones analíticas, pero no satisfacer las exigibles por razón de su origen en cuanto a degustación y aroma.

Creemos que una primera etapa de la posible identificación de un vino, queso o cualquier otro alimento de origen reconocido, debería consistir en la mención de aquellos componentes que le son peculiares o en la fijación de cifras de otros constituyentes comunes que se mantienen en niveles fijos distintivos.

A primera vista, está la dificultad de la gran variedad de levaduras que dan carácter a la elaboración, pero también sabemos que esta libre concurrencia, no se da en la misma, es más, hoy las industrias de la fermentación se mejoran con el empleo de levaduras seleccionadas, y son conocidas de todos, lo que de rituales tienen las manipulaciones en la vinificación.

Probablemente no exista industria española alimenticia tan vieja y famosa como la de los "caldos" de Jerez. A. SCHULTEN (3) afirma que el ánfora con la inscripción "Vinum gaditanum" del año 31 a. de JC. alude a ella.

TREMOLIERES y col. (4), opinan que el control de origen, tienen el mérito de mantener el respeto de ciertos criterios organolépticos y lo juzgan como insuficiente, apuntando, que ciertas exigencias analíticas, lo son con visión internacional que no impide a cada país interesarse especialmente en la calidad de sus alimentos.

Esta preocupación, es una necesidad en España, por el valor económico que la industria del vino representa.

Su análisis es de una gran complejidad (5), apuntemos como detalle que la fermentación lleva consigo la formación de nuevos ácidos (6) y no obstante el contenido en lo que a acidez fija libre se refiere es mayor en el mosto inicial.

Las técnicas cromatográficas ofrecen en algunos trabajos (7) aportes sustanciales para la diferenciación de los vinos como ocurre en la apreciación a la luz ultravioleta de los precedentes de uvas secas y los de elaboración corriente.

Ocasionalmente en España se demostró mayor interés analítico por las bebidas alcohólicas como consecuencia de la intoxicación metilica, pero en Francia (8) es frecuente la aparición de trabajos de investigación cromatográfica de los glucósidos de los híbridos, productores naturales de este alcohol (9), evidenciando una preocupación permanente por los problemas enológicos.

En la investigación de ácidos y aminoácidos, se hace uso de la absorción en columna y el desarrollo en capa fina sobre gel de sílice, no obstante la cromatografía en papel se sigue aplicando en estas investigaciones como lo demuestra el hallazgo de un nuevo aminoácido en un *Boletus* (10).

Ya se consigue la identificación de un queso Edam (10) por la investigación cromatográfica en papel de la glucosa y por esta misma técnica los aminoácidos existentes en tipos diversos de uvas y limón (11).

El mismo proceso de maduración del queso se sigue cromatográficamente (11) al modo como se ha intentado seguir el proceso aún más lento del envejecimiento de un vino, por las modificaciones en su materia colorante (12) y aminoácidos (11).

PROCOPIO (11), establece diferenciación entre los tintos y blancos italianos por el mayor contenido en aminoácidos de los primeros.

La investigación no cesa, y encuentran que la bondad de los grandes vinos de Borgoña está ligada al proceso de fermentación maloláctica subsiguiente (5), apuntemos como detalle que

a la fermentación alcohólica propiamente dicha (13).

Tres caminos ensayan los investigadores franceses para acelerar y dirigir este proceso: la desacidificación del mosto, la siembra con bacterias y el empleo de lias de vinos que ya sufrieron este proceso.

Estos mismos autores aconsejan para comprobar la marcha del mismo, la investigación cromatográfica sobre el papel del ácido málico.

Pero la misma complejidad de la elaboración aparece porque un vino casi desacidificado se hace "vulgar" y "flojo" (14), ya que en su gusto confluyen el contenido en alcohol y el de ácidos.

También los métodos físicos tienen cabida en Enología, y así por espectrofotometría (15) se diferencian aquéllos que han sufrido quiebra oxidásica de los normales.

Se ha iniciado la separación de diferentes antocianos (16), que permite la distinción entre diferentes tipos y evidenciar algunos de sus tratamientos (17), pero no se consigue por otros ensayos (5) el envejecimiento artificial.

Lo expuesto anteriormente indica la preocupación de la investigación en buscar nuevos datos químicos que suplan el carácter eminentemente subjetivo de la cata (18), ya que tanto en Francia como en España el origen de un vino se acredita por un certificado que tiene como base un análisis químico clásico y la indispensable degustación analítica.

En este sentido, creemos haber contribuido a completar el informe, con datos exclusivamente químicos.

La finalidad del trabajo que ofrecemos es buscar las diferencias entre vinos de origen reconocido de algunas comarcas españolas por su contenido en oligoelementos o mediante cromatografía en papel de otros elementos de los vinos. De los oligoelementos que el vino contiene se eligió el hierro, por ser el más constante de todos ellos.

Como la manipulación está consagrada por la costumbre, y el contenido en hierro es más consecuencia de la elaboración que del aporte inicial en la vendimia, las cifras de hierro se mantienen entre límites variables que no caracterizan completamente al vino de

una comarca, por ello se ha recurrido a la cromatografía en papel de otros elementos de los vinos como son los aminoácidos y ácidos.

INVESTIGACION DE LOS AMINO-ACIDOS DEL VINO POR CROMATO-GRAFIA EN PAPEL

DESCRIPCIONES Y ELECCION DE LA TECNICA SEGUIDA

Papel empeado y puesta de muestra. Hemos utilizado en muchos cromatogramas el papel Whatman n.º 1 y n.º 4 para finalmente adoptar el Schleicher-Schull 2043-b.

La puesta de muestra se realiza en espacios de 0'5 centímetros o de 2'5 centímetros según los casos, y en cantidad variable de 30 a 60 microlitros como se indica oportunamente.

Hemos prescindido de la extracción de los aminoácidos por la acetona clorhídrica, como han hecho otros autores españoles (19), porque empleada directamente la muestra, es correcto su desarrollo, incluso en aquellas con abundante materia colorante, que en su mayoría queda en el origen.

Solventes de desarrollo.—Se emplearon los siguientes solventes:

Butanol-Acido acético-Agua (4-1-5)
Partridge (20)

Butanol-Acido acético-Agua (2-1-1)
(18)

obteniendo mejores resultados con el segundo que se eligió como definitivo.

Tiempos de saturación y desarrollo.

Los cromatogramas los hemos mantenido un tiempo de saturación variable, desde 4 hasta 24 horas, para finalmente prescindir del mismo, al comprobar que no se manifiesta su influencia.

El desarrollo ha sido para la cromatografía ascendente, en papel arrollado sobre placa de Petri, cerrado por campana. El tiempo del mismo ha sido de 20 horas.

En los cromatogramas que luego se indican, el desarrollo se hace con técnica ascendente con el cromatograma suspendido.

Creemos que la cromatografía ascendente tiene indudables ventajas de comodidad cuando se realiza con la hoja

suspendida, así como la zona de inmersión es regular y el desarrollo correcto.

El desarrollo de un cilindro apoyado en una placa de Petri, depende de la horizontalidad de la superficie de apoyo y de la regularidad del borde sumergido.

Secado y Revelado.—El cromatograma se deja a la temperatura ambiente durante unas dos horas, y una vez seco, se revela pulverizando con solución de Ninhydrina en acetona (20). Disolver 0'3 gramos de Ninhydrina en 95 mililitros de acetona. Para obtener mayor contraste entre los aminoácidos, es aconsejable llevar el cromatograma a la estufa durante 1 1/2 horas a 37° C, en lugar de hacerlo 1/2 hora a 80° C como apuntan otros trabajos (20).

Hemos notado que para evitar manchas extrañas en el cromatograma, la pulverización con Ninhydrina debe ser fina; si fue en alguna parte grosera, hay que dejar secar el cromatograma espontáneamente antes de llevarlo a la estufa.

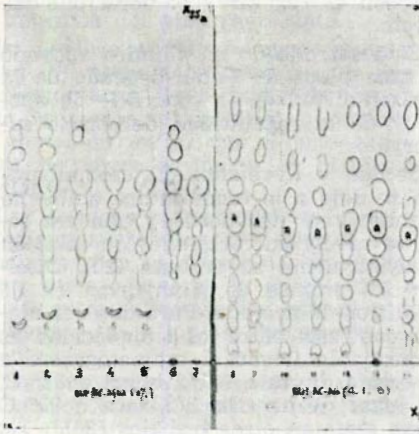
PARTE EXPERIMENTAL

Los cromatogramas 35-a y 35-b (figura 1) solo difieren en el líquido de desarrollo, que en el primero es el Butanol-Acido acético-Agua en la proporción de 2-1-1 y en el segundo en la proporción más clásica de 4-1-5.

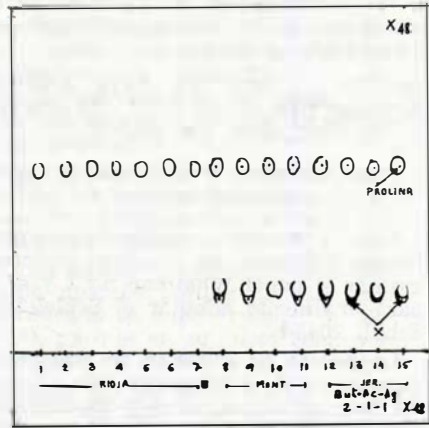
Su desarrollo ha sido simultáneo y el frente solvente llegó a una misma altura en ambos cromatogramas, no obstante sus resultados difieren: en el primero hay un mayor recorrido de los aminoácidos y aparecen manchas que no se evidencian en el segundo.

En el cromatograma 35-a se aprecia que la mancha semilunar es común a las muestras de los puntos 1 y 2 que son de origen "Montilla" y a las correspondientes a los puntos 3, 4 y 5 que son de origen "Jerez", en tanto que no se evidencia en las muestras de los puntos 6 y 7 de origen "Rioja"

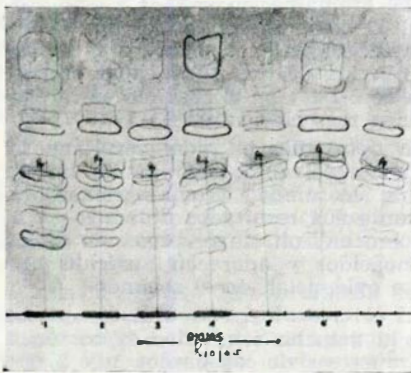
Estas manchas presentan márgenes con diferente colorido y cuya misma forma las distingue de las restantes. Quizá la forma semilunar se deba a su arrastre por afinidad de otra sustancia o adaptación por el mismo desarrollo y así parece, porque con el tiempo la



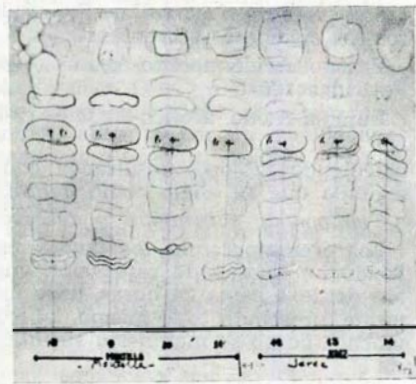
(R-113-67) FIGURA 1



(R-114-67) FIGURA 2



(R-115-67) FIGURA 3



(R-116-67) FIGURA 4

mancha
amarilla oval.

Las diferencias apuntadas llevan a elegir como líquido de desarrollo el

Butanol-Acido acético-Agua en la proporción de 2-1-1 para el cromatograma siguiente, que da cabida a un total de 15 muestras (figura 2).

CROMATOGRAMA X-48 (Fig. 2)

Puntos	Muestras	Cantidad
1	Rioja tinto	30 microlitros
2	Rioja tinto	"
3	Rioja tinto	"
4	Rioja tinto	"
5	Rioja 3.º año tinto	"
6	Rioja 3.º año tinto	"
7	Rioja 3.º año blanco	"
8	Montilla	"
9	Montilla	"
10	Montilla	"
11	Montilla	"
12	Jerez fino	"
13	Jerez oloroso	"
14	Jerez oloroso	"
15	Jerez oloroso	"

Papel Whatman n.º 1. Dimensiones: 38 cm. × 30 cm.

Tiempo de saturación: 22 horas

Tiempo de desarrollo: 23 horas 30 minutos

Revelador: Ninhydrina

La diferenciación se mantiene. Las muestras de origen "Montilla" y "Jerez" presentan manchas rojas que no se ven en las de origen "Rioja". Estas manchas tienen un recorrido referido a la Prolina de 0'26. Una sola excepción es la muestra de Montilla del punto 10 que es también excepcional en otras investigaciones. Así ocurre al someterlas a electroforesis, en otras experiencias, junto con otras tres de Montilla.

Como parece que la sustancia pro-

blema se imbrica con la que el tiempo revela como blanco-amarillenta, es aconsejable en estos casos la puesta de la muestra en banda, así como reducir comparativamente la cantidad.

Estas condiciones cumplen los cromatogramas X-52, X-53 y X-54, en los que la muestra se extiende a lo largo de 2'5 centímetros con una distancia entre bandas de 1'5 centímetros y en la cantidad de 60 microlitros.

CROMATOGRAMA X-52 (Fig. 3)

Puntos	Muestras	Cantidad
1	Rioja tinto	60 microlitros
2	Rioja tinto	"
3	Rioja tinto	"
4	Rioja tinto	"
5	Rioja 3.º año tinto	"
6	Rioja 3.º año tinto	"
7	Rioja 3.º año blanco	"

Papel Whatman n.º 1. Dimensiones: 30 cm. × 30 cm.

Tiempo de saturación: 4 horas

Tiempo de desarrollo: 20 horas

Revelador: Ninhydrina

CROMATOGRAMA X-53 (Fig. 4)

Puntos	Muestras	Cantidad
8	Montilla	60 microlitros
9	Montilla	"
10	Montilla	"
11	Montilla	"
12	Jerez fino	"
13	Jerez oloroso seco	"
14	Jerez fino	"

Papel Whatman n.º 1. Dimensiones: 30 cm. × 30 cm

Tiempo de saturación: 4 horas

Tiempo de desarrollo: 20 horas

Revelador: Ninhydrina

CROMATOGRAMA X-54 (Fig. 5)

Puntos	Muestras	Cantidad
15	Jerez fino	60 microlitros
16	Jerez fino	"
17	Jerez amontillado	"
18	Jerez fino	"
19	Jerez oloroso	"
20	Jerez oloroso	"
21	Jerez palo cortado	"

Papel Whatman n.º 1. Dimensiones: 30 cm. × 30 cm.

Tiempo de saturación: 4 horas

Tiempo de desarrollo: 20 horas

Revelador: Ninhydrina

Para ampliar el número de muestras se realiza el cromatograma X-55, en igualdad de condiciones y cantidad de muestra, dando cabida junto a nuevas muestras de Jerez y Rioja a dos de Valdepeñas (blanco y tinto).

La banda de escaso recorrido del aminoácido desconocido, aparece en las muestras de Jerez y falta en las de Rioja y en las ensayadas de Valdepeñas.

CROMATOGRAMA X-55 (Fig. 6)

Puntos	Muestras	Cantidad
22	Jerez dulce	60 microlitros
23	Jerez oloroso	"
24	Jerez fino	"
25	Rioja tinto	"
26	Rioja tinto	"
27	Valdepeñas blanco	"
28	Valdepeñas tinto	"

Papel Whatman n.º 1. Dimensiones: 30 cm. × 30 cm

Tiempo de saturación: 4 horas

Tiempo de desarrollo: 20 horas

Revelador: Ninhydrina

En ninguna de las nueve muestras de la zona "Rioja" que incluyen blancos y tintos, aparece mancha alguna de tales características. En las 17 restantes de procedencia "Montilla" y "Jerez", aparece la mancha de características iguales en colorido y tamaño. una sola excepción es la muestra que

ya apuntamos anteriormente correspondiente a un "Montilla" cuya mancha similar pero no idéntica posee un R-prolina distinto.

En la siguiente tabla damos los recorridos de la sustancia o sustancias desconocidas, referidos a la Prolina.

T A B L A

Puntos	Muestras	R-prolina
8	Montilla	0'34
9	Montilla	0'34
10	Montilla	(0'41)
11	Montilla	0'30
12	Jerez fino	0'29
13	Jerez oloroso	0'28
14	Jerez fino	0'28
15	Jerez fino	0'30
16	Jerez fino	0'28
17	Jerez amontillado	0'27
18	Jerez fino	0'28
19	Jerez oloroso	0'28
20	Jerez oloroso	0'30
21	Jerez palo cortado	0'31
22	Jerez dulce	0'30
23	Jerez oloroso	0'32
24	Jerez fino	0'30

R-prolina valor medio: 0'30

Las manchas se nos muestran, a pesar del tiempo transcurrido, con la apariencia inicial de una doble franja, rojiza la inferior, y blanquecina la superior, contraste que se intensifica con el tiempo. La muestra correspondiente al punto 10 da una mancha sencilla, es decir, de colorido uniforme.

El cromatograma X-48 de una parte, y los cromatogramas X-52, X-53, X-54 y X-55 de otra, admiten comparación porque los líquidos de desarrollo han sido idénticos, si bien las cantidades de muestra de estos últimos han sido comparativamente menores por la razón apuntada.

La sustancia o sustancias desconocidas, tienen en ambos tipos de cromatograma un R-prolina casi idéntico:

Cromatograma X-48

Cromatograma X-53, X-54 y X-55

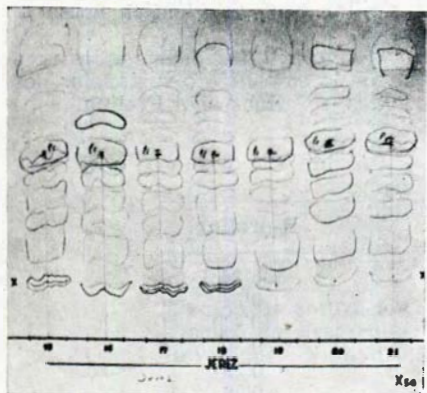
R-prolina valor medio 0'26

R-prolina valor medio 0'30

Se han hecho otros cromatogramas que amplían el número de muestras de diferente origen y cuyos resultados concuerdan con los anteriormente expuestos.

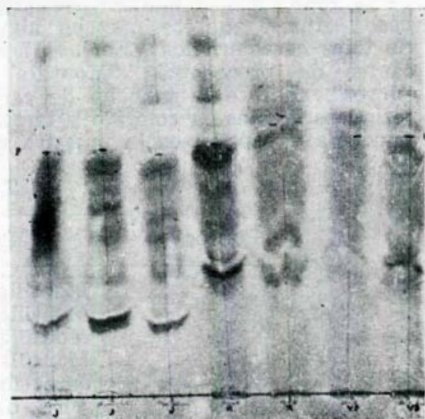
Como alimentos de comparación en su contenido en aminoácidos por cromatografía, se han empleado cuatro muestras distintas de cerveza y una de sidra. El desarrollo de las primeras es muy similar al de los vinos, pero carecen todas ellas de la mancha típica que distingue a los vinos de Jerez y de Montilla.

El contenido en aminoácidos de la sidra ensayada, es nulo para 40 microlitros de muestra por centímetro. Por este motivo, la hemos utilizado como sustrato cromatográfico, en experiencias posteriores de identificación del aminoácido que tipifica los vinos de Jerez y Montilla, con el fin de que los aminoácidos testigo se desarrollen en condiciones semejantes a como lo hacen en el vino mismo.



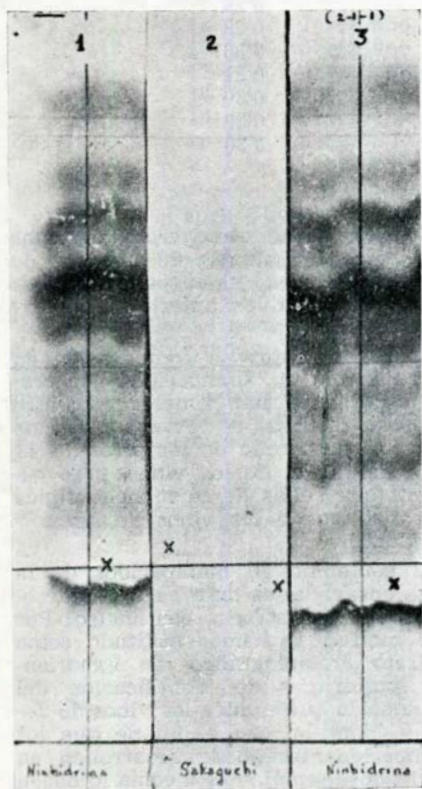
(R-117-67)

FIGURA 5



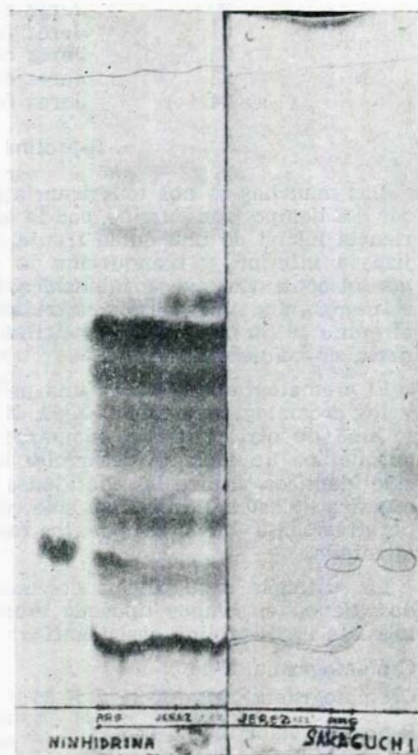
(R-118-67)

FIGURA 6



(R-119-67)

FIGURA 7



(R-120-67)

FIGURA 8

NATURALEZA DE LA BANDA QUE DISTINGUE A LOS VINOS DE MONTILLA Y DE JEREZ

Para poder identificar la sustancia por reacciones específicas, hemos realizado un cromatograma en banda continua, con una concentración próxima al doble de los anteriores, 40 microlitros por centímetro (figura 7).

El Rf de la sustancia, orienta nuestra investigación hacia la Arginina. Una vez desarrollado, cortamos del cromatograma tres bandas numeradas, la 1 y la 3 laterales, se revelan con el reactivo de Ninhydrina, y la banda n.º 2 central, con el reactivo de Sakaguchi, que consta de dos soluciones (21).

Solución 1

Oxina 0'2 gramos
Acetona... .. 100 mililitros

Solución 2

Bromo líquido 0'2 ml
Hidroxido sódico sol. 10 % 100 ml

Se rocía el cromatograma con la solución 1 y una vez evaporada la acetona se rocía con la solución 2 y se deja secar espontáneamente.

Este reactivo es válido para la Arginina y derivados monosustituídos con los que da coloración rojo-naranja.

El reactivo citado ha sido de elección, porque la fórmula que dan otros textos (20), consistente en una solución alcalino-acuosa de alfa-naftol al 0'1 %, presenta dificultad para el desecado y con ello las manchas aparecen más tarde desplazadas de su localización original.

RESULTADOS Y DISCUSION

Unidas las bandas ya reveladas, se aprecia con claridad la continuidad de la mancha revelada por la Ninhydrina y por el Sakaguchi. Este resultado nos permite afirmar que la sustancia es Arginina o un derivado monosustituído de ella (21).

Para aclarar esta doble posibilidad, realizamos en las condiciones que se indican, dos cromatogramas iguales, en los que se dispone en el espacio de un centímetro, sobre un sustrato cuyo comportamiento cromatográfico es similar al del vino (Sidra), una muestra de solución patrón de Arginina y en banda de 7 centímetros, una muestra de vino de Jerez. El centímetro final de esta banda, se sobrecarga con solución patrón de Arginina, en cantidad igual a la empleada sobre el sustrato mencionado.

ESQUEMA DE ESTOS CROMATOGRAMAS

Banda de 7 cm.	40 microlitros de vino de Jerez por cm.
Ultimo cm. de la banda	incremento de 4 microlitros de solución patrón acuosa al 1 % de clorhidrato de Arginina
Banda de 1 cm.	40 microlitros de sidra y 4 microlitros de la solución patrón de Arginina

Papel Schleicher-Schüll 2043-b. Dimensiones: 30 cm. × 13 cm.
Tiempo de desarrollo: 20 horas
Reveladores: Ninhydrina o Sakaguchi
Cromatografía ascendente con el cromatograma suspendido

Un cromatograma se revela con el reactivo de Sakaguchi y el otro con el reactivo de Ninhydrina, dando el resultado siguiente: En ambos, se aprecia que la Arginina dispuesta sobre la banda de vino de Jerez, se resuelve en dos manchas, una que coincide en altura

con la mancha de la Arginina patrón dispuesta sobre el sustrato de sidra, y otra que incrementa la banda típica que investigamos.

Es razonable pensar, que en el vino existe una sustancia con gran capacidad reactiva para ligarse a la Argini-

na, empleada en forma de clorhidrato, dando un compuesto que es el mismo que investigamos, ya que su comportamiento cromatográfico es idéntico.

Para hacer más demostrativas estas

experiencias, las hemos conjuntado en un solo cromatograma simétrico (figura 8), revelando cada mitad con los reactivos citados.

ESQUEMA DE ESTE CROMATOGRAMA

Banda de 12 cm.	40 microlitros de vino de Jerez cm.
Bandas de 1 cm. a ambos lados	incremento de 4 microlitros de sol. patrón de Arginina
Dos extremos marginales de 1 cm. de la citada banda	40 microlitros de sidra y 4 microlitros de la sol. patrón de Arginina en cada

Papel Schleicher-Schüll 2043-b. Dimensiones: 34 cm. × 20 cm.

Tiempo de desarrollo: 20 horas

Reveladores: Ninhydrina y Sakaguchi

Cromatografía ascendente con el cromatograma suspendido

DISCUSION

Por cromatografía, hemos visto que existen derivados de la Arginina en los vinos. Establecida la diferencia cromatográfica de los vinos de Montilla, Jerez, Rioja y Valdepeñas, por la existencia en los dos primeros de una banda que no poseen los otros, e identificada esta banda como un derivado monosustituido de la Arginina, podemos afirmar que en las condiciones de trabajo en que se opera, hay una clara diferencia por cromatografía, teniendo este derivado de la Arginina, cuyo R_f y líquidos de desarrollo se concretan, los vinos procedentes de las zonas de Montilla y Jerez y careciendo de él, los procedentes de las zonas de Rioja y Valdepeñas.

Los caracteres hallados para cualquier muestra de los vinos ensayados, se han mantenido constantes como hemos comprobado al utilizar la muestra con distinta finalidad o por haber sido renovada, ya que su curación fuera del frigorífico es limitada.

La existencia de Arginina en los vinos, ha sido señalada por varios autores (18) (22) y es uno de los aminoácidos más difundidos en los alimentos (22).

INVESTIGACION DE LOS ACIDOS DEL VINO POR CROMATOGRAFIA EN PAPEL

Apuntábamos en otro lugar, que la degustación es el medio habitual de

controlar la elaboración y definir el origen de un vino y en este terreno del gusto del vino, nos remitimos a la opinión de TREMOLIERES y cols. (4)), que literalmente dicen que "las cualidades gustativas del vino, muy variables, según la variedad de la viña, el suelo y las condiciones meteorológicas de cada país y de cada año, son debidas a una cierta relación entre el contenido en alcohol, la acidez y la presencia de ciertas sustancias volátiles de naturaleza conocida o desconocida".

El papel de los ácidos en el vino es múltiple, le dan sabor, intensifican su coloración y facilitan su conservación.

Así, el ácido succínico, es de los que más contribuyen a su sabor, y el ácido Cítrico forma con el hierro férrico un anión complejo soluble del que se hace uso para prevenir la quiebra férrica (18).

TECNICA ELEGIDA

Papel.—Se empleó el papel Schleicher-Schüll 2043-b con buenos resultados.

Cantidad.—Iguales a las citadas anteriormente, es decir, de 30 a 60 microlitros.

Solventes.—Se han empleado los siguientes:

Etanol - Amoniaco - Agua (80 - 5 - 15) (Cheftel) 1953 (51)

n-Butanol-Ac. Fórmico-Agua (10-2-15) Kalyankar 1952 (51)

Soluciones patrón.—Se prepararon

soluciones al 5 % de los ácidos patrón, Tartárico, Cítrico, Málico, Láctico y Succínico en mezcla a partes iguales de Acetona-Agua (V/V).

El ácido fumárico, resulta poco soluble y se aclara un poco la solución cuando se le añade pequeña cantidad de alcohol (1 mililitro de alcohol para 4 mililitros de mezcla Acetona-Agua).

Revelador.—Se empleó el de Paskova y Munk (24):

Solución 1: 0'075 % de verde de bromocresol más 0'025 % de azul de bromofenol en alcohol absoluto.

Solución 2: 0'5 % de permanganato potásico más 1 % de carbonato sódico decahidratado, en agua destilada.

Ambas soluciones son estables.

Mezcladas éstas, se proyecta inmediatamente, porque su duración es de 5-10 minutos. Dejar secar espontáneamente y anotar la aparición de las manchas y su colorido a intervalos de 5, 10, 15 y 30 minutos desde su proyección.

COMENTARIOS AL EMPLEO DE ESTE REVELADOR

Las ventajas del revelador las exponemos a continuación.

Ya hemos citado que el azul de bromofenol, por sí solo, bien disuelto en alcohol o añadido al líquido de desarrollo, no ofrece gran contraste ni diferencias de matiz para los distintos ácidos; aquí, los ácidos tienen colores y matices en la evolución del revelado que ayudan a su identificación.

Como antecedentes al empleo de este revelador, hemos encontrado la asociación de azul de bromofenol y permanganato. Los autores (25), que lo emplean para revelado en capa fina, atribuyen la diferente coloración a la acidez de los productos de Oxidación del permanganato.

También se cita (23) una solución alcalina de permanganato. Otras fórmulas semejantes, obligan a una doble pulverización y presentan menos especificidad (26).

Por este revelador, la determinación del Rf se ve facilitada, porque a diferencia de otros muchos (rojo de metilo, diclorofenolindofenol), la mancha presenta un núcleo que corresponde a

la mayor concentración de ácido; esto es más estimable tratándose de manchas de forma irregular o con colas, en las que no es posible señalar el centro de la misma.

El contraste entre dos ácidos, se mantiene a veces, aunque las manchas estén imbricadas, como sucede en el cromatograma de la figura 6, con los ácidos fumárico y succínico, en donde la existencia del fumárico, se aprecia por transparencia a través del succínico. Y lo que es más interesante, localizarla aunque espontáneamente estuviera oculta por este ácido.

La apariencia de los cromatogramas es muy semejante, aunque los líquidos de desarrollo difieren fundamentalmente, como sucede entre Etanol-Amónico-Agua (80-5-15) y n-Butanol-Ac. Fórmico-Agua (10-2-15).

Las coloraciones evolucionan lentamente pasados 30 minutos, conservándose en muchos ácidos las diferencias peculiares, transcurridos algunos meses. Este hecho no es común a todos, por lo que aconsejamos señalar el centro de la mancha a los 30 minutos de la pulverización.

Hemos podido apreciar que la fugacidad de algunas manchas se debía a las mínimas cantidades de ácidos existentes.

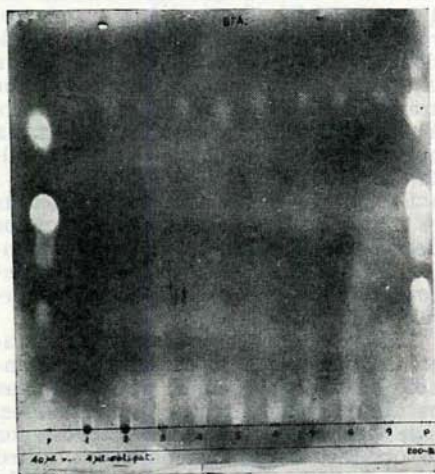
Las proporciones dadas por los autores para la mezcla de las dos soluciones son las más acertadas, disminuyendo el contraste o perdiéndose las manchas cuando se modifica.

A diferencia de otros trabajos, en los que se exagera el valor de la técnica personal, creemos que los autores han aportado a la identificación cromatográfica de los ácidos, más de lo mencionado en su publicación.

EXPERIENCIAS

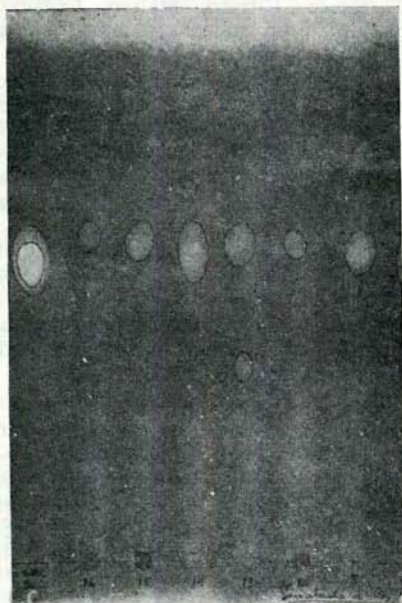
Primeramente, realizamos cromatogramas con la cantidad de 20 microlitros de muestras, dispuestas en puntos con un diámetro máximo de la mancha de 0'5 centímetros, y desarrolladas juntamente con las soluciones patrón en Butanol-Ac. Fórmico-Agua. Apreciamos que sólo aparecen manchas de ácidos en las muestras de Montilla y su aparición no es común en las restantes.

Por esto incrementamos la cantidad a 40 microlitros como podemos apreciar en el cromatograma 200-R (figura 9).



(R-121-67)

FIGURA 9



(R-122-67)

FIGURA 10

CROMATOGRAMA 200-R

Puntos	Muestras	Cantidad
P	Patrones	4 microlitros de cada
1	Rioja alta tinto	40 microlitros
2	Rioja tinto	"
3	Rioja alta blanco	"
4	Montilla	"
5	Montilla	"
6	Montilla	"
7	Jerez palo cortado	"
8	Jerez fino	"
9	Jerez fino	"
P	Patrones	4 microlitros de cada

Papel Schleicher-Schüll 2043-b. Dimensiones: 30 cm. × 29 cm.

Tiempo de desarrollo: 13 horas

Revelador: Paskova y Munk

P.= Tartárico, Cítrico, Málico, Fumárico, Succínico y Láctico

Aparece una sola mancha en cada muestra, que representa a los ácidos Succínico y Láctico existentes. Superpuestos y sin posible distinción entre

sí, por la proximidad de sus R_f, y la semejanza que en su evolución final presenta su revelado por esta técnica, como puede apreciarse por las anota-

ciones hechas en tiempos distintos, incluidas en otro lugar.

Las muestras de Montilla, dan una mancha mayor que las de Jerez, y esta diferencia se acentúa con relación a las de Rioja, de las que alguna, como la muestra correspondiente al punto 3, apenas se insinúa.

Con nuevas muestras de diferente origen, realizamos otro cromatograma, disponiendo como patrones los ácidos Succínico y Láctico, únicos revelados anteriormente.

ESQUEMA DE ESTE CROMATOGRAMA (Fig 10)

Puntos	Muestras	Cantidad
P	Patrones	4 microlitros de cada
16	Rioja tinto	40 microlitros
15	Rioja tinto	"
14	Montilla	"
13	Valdepeñas blanco	"
12	Valdepeñas tinto	"
5	Montilla	"
P	Patrones	4 microlitros de cada

Papel Schleicher-Schüll 2043-b. Dimensiones: 29 cm. × 22 cm.

Tiempo de desarrollo: 13 horas

Revelador: Paskova y Munk

P.= Láctico y Succínico

En este cromatograma aparece en la muestra 13 Valdepeñas, un nuevo ácido cuyo Rf de 0'41 lo adscribe el ácido cítrico. Los valores de contenido en ácido Láctico y Succínico comparativamente de las muestras, es por apreciación visual, en orden decreciente: Montilla, Valdepeñas y Rioja.

En los puntos extremos, hemos bordado la mancha central, para demostrar como aunque superpuestas, se distinguen pasadas 48 horas, los ácidos Succínico y Láctico, mostrándose el primero (mancha del centro) con un matiz más claro y homogéneo.

Con la técnica seguida y en cantidad de 40 microlitros de muestra, se han hecho varios cromatogramas con vinos de Valdepeñas, apareciendo en todos ellos el ácido cítrico.

CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL

El interés que tiene la comprobación de la presencia del ácido Láctico, así como la conveniencia de ver si las diferencias reseñadas eran atribuibles a la suma de los ácidos Succínico y Láctico o deben atribuirse a uno de ellos por separado, nos ha llevado a realizar la cromatografía bidimensional.

El papel, las soluciones patrón y el revelador, son los mismos utilizados anteriormente.

La cantidad de muestra problema, es de 40 microlitros de cada, realizándose la cromatografía con tres muestras de un mismo origen.

Los solventes son los mismos, empleándose para el primer desarrollo Etanol-Amoniaco-Agua (80-5-15), y para el segundo Butanol-Fórmico-Agua (10-2-15).

TECNICA SEGUIDA Y PUESTA DE MUESTRA DE LAS SOLUCIONES PATRON

En láminas de papel Schleicher-Schüll 2043-b de 30 cm × 20 cm se trazan dos líneas paralelas a cada uno de los bordes próximos, distando de ellos 0'5 cm y 2'5 cm, con lo que se forman dos puntos de intersección. En el más interior, depositamos las muestras de vino o los ácidos patrón (27).

Se miden 4 microlitros de ácido Tartárico, Succínico, Cítrico y Málico, 12 microlitros de ácido Fumárico y 16 microlitros de ácido Láctico de las soluciones patrón anteriores, disponiéndose todos en pequeña cápsula de vidrio, con

el fin de reducir volumen por evaporación espontánea de la acetona-agua, y facilitar así la puesta de muestra.

Se toman los patrones de la cápsula, lavando con mínimas cantidades de solvente, hasta que no quede mancha apreciable.

Este artificio gana en rapidez y regularidad a la puesta de muestra por separado de cada ácido.

El papel se dispone en cubeta de vidrio de 60 cm de altura y 28 cm \times 21 cm de anchura y longitud. La lámina suspendida, se sumerge en el primer líquido de desarrollo, hasta que el nivel del mismo coincide con la línea más inferior. Se toma la cubeta y se deja en desarrollo 12 horas. Sacamos el papel, que se deja secar espontáneamente 6 u 8 horas, señalando el frente de desarrollo, más perceptible con luz ultravioleta. Bajo este revelador, la línea vertical trazada a lápiz sobre el papel, debe ser eje de simetría del recorrido del vino, si el desarrollo ha sido correcto.

Se pliega el papel en cilindro, con ayuda de sujetadores de plástico, tomando la línea del desarrollo anterior, como línea base y empleando el segundo solvente.

Disponer este líquido en placa Petri de 14'5 cm de diámetro, en cantidad que no rebase los 2-3 milímetros de altura. Colocar el cromatograma en la placa y cubrir con campana de 33 cm de diámetro \times 48 cm de altura, dejando estar 13 horas.

Al final de este tiempo, el recorrido del segundo solvente es aproximadamente igual al del primero. Dejar secar espontáneamente el cromatograma durante 3 horas y rociar en vitrina el revelador mencionado.

Terminada la pulverización, anotar en un papel la evolución de las manchas y su localización a los 5, 10, 15 y 30 minutos de la pulverización.

EXPERIENCIAS

CROMATOGRAMAS TESTIGO

Es aconsejable y utilizado por nosotros, el desarrollo en cada solvente, de un cromatograma padrón unidimensional, simultáneamente al bidimensional, aunque este último se realiza también con ácidos patrón

Su utilidad puede ser grande, y resulta indispensable si el cromatograma bidimensional es de muestra problema. Cualquier anomalía en el desarrollo, se manifestaría igualmente en el cromatograma testigo.

Ejemplos de los cromatogramas patrón, así como de uno de los testigos, son los incluidos en las figuras n.º 11, 12 y 13.

A los cromatogramas realizados con muestras de vino corresponde el de la figura 14, realizado con tres muestras de Montilla, en el que se separan claramente los ácidos Succínico y Láctico, que comparativamente con cromatogramas realizados con muestras de las zonas de Jerez, Rioja y Valdepeñas, presenta un mayor contenido en ambos ácidos, por ser mayor su mancha y mucho mayor su contraste.

Para comprobar hasta qué punto la cromatografía bidimensional nos permitió comparar muestras de distinta procedencia para establecer cierta relación cuantitativa, hemos realizado un cromatograma con 40 microlitros de Montilla para compararlo con el obtenido con 120 microlitros procedentes de tres.

Visualmente se aprecia de modo aproximado, esta relación cuantitativa de 1 a 3.

RESULTADOS Y DISCUSION

De las experiencias en ambas modalidades de cromatografía, deducimos lo siguiente:

Los vinos españoles ensayados, poseen los ácidos Succínico y Láctico, que se evidencian en una sola mancha por cromatografía monodimensional en cantidad de 40 microlitros, y por separado en cantidad de 120 microlitros, para cromatografía bidimensional de grupo.

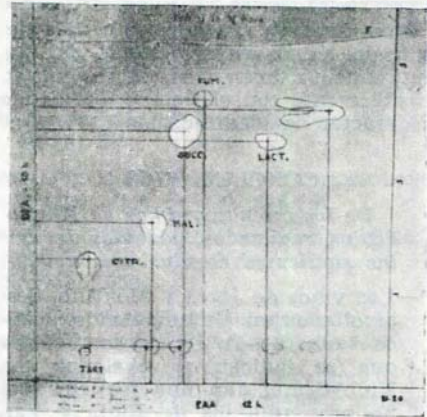
KAYSER (18) señaló el ácido Láctico como componente del vino y los trabajos de RIBEREAU-GAYON (18) han establecido la presencia generalizada de este ácido en los vinos de Burdeos.

Los vinos de la zona de Montilla-Moriles, son los que tienen mayor cantidad de estos ácidos.

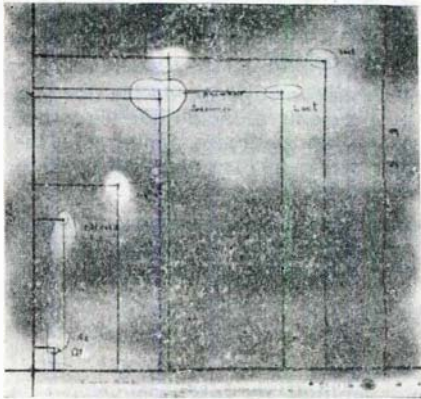
En cromatografía monodimensional, solo ha aparecido en dos muestras de Rioja el ácido Málico.



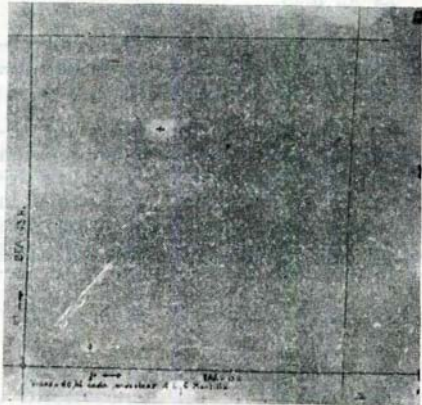
(R-123-67) FIGURA 11



(R-124-67) FIGURA 12



(R-125-67) FIGURA 13



(R-126-67) FIGURA 14

En cromatografía monodimensional y bidimensional, aparece el ácido Cítrico en todas las muestras ensayadas de Valdepeñas.

De los restantes ácidos, en las cantidades empleadas, existen indicios, pero no se concretan en manchas persistentes.

Los resultados obtenidos por nosotros, concuerdan con las experiencias piloto realizadas por IÑIGO y cols. (28) que manejando 18 especies de levaduras, encuentran siempre en el mosto fermentado, los ácidos Láctico y Succínico.

Disentimos en cuanto a la crítica del indicador de Paskova y Munk, del que textualmente dicen "los colores varían sensiblemente con el tiempo, perdiendo su carácter de identificación".

CONCLUSIONES

De los cromatogramas de Aminoácidos, realizados, podemos deducir las siguientes conclusiones:

- 1.^a—Los vinos de Jerez y Montilla, desarrollados en Butanol-Acido acético-Agua (2-1-1), en las condiciones que se indican y revelados con Ninhydrina, dan una mancha que no presentan los de Rioja y Valdepeñas en igualdad de condiciones.
- 2.^a—Para 24 microlitros de muestra por centímetro y en las restantes condiciones que se indican, el R-prolina medio de la sustancia típica es de 0'30.
- 3.^a—La sustancia típica, da reacción positiva con los reactivos de Ninhydrina y de Sakaguchi.
- 4.^a—La solución de clorhidrato de Arginina, empleada como sobrecarga en cromatogramas de vinos de Jerez y de Montilla, incrementa la banda típica que da las reacciones de Ninhydrina y de Sakaguchi, por lo que esta banda típica es un de-

rivado monosustituído de la Arginina.

- 5.^a—La sustancia contenida en los vinos de Jerez y Montilla, que da lugar a este derivado, tiene una gran capacidad reactiva porque la forma en el propio cromatograma.

En cuanto al revelado y cromatografía de los Ácidos:

- 1.^a—Damos cuenta de la evolución de los ácidos en el revelado, ampliando el trabajo de Paskova y Munk en líquidos de desarrollo alcalino y ácido.
- 2.^a—Hallamos un polímero del ácido láctico en las muestras ensayadas de Jerez y de Montilla, sin haber encontrado antecedentes bibliográficos.

Realizando la cromatografía en las condiciones que se indican, deducimos que:

- 3.^a—Por cromatografía monodimensional comparada, las muestras de vinos de Montilla proporcionan una mancha de los ácidos láctico y succínico mayor que las de Jerez, y estas a su vez, mayor que las de Rioja.
- 4.^a—Únicamente en los vinos ensayados de Valdepeñas, aparece la mancha de ácido cítrico.
- 5.^a—Los vinos españoles ensayados, poseen los ácidos láctico y succínico que se evidencian en una sola mancha por cromatografía monodimensional y en dos por cromatografía bidimensional.
- 6.^a—La mancha superior de las dos que proporciona el ácido láctico puro, es de un polímero fácilmente hidrolizable, incluso por el hidróxido sódico en frío.
- 7.^a—Para una buena extracción de los ácidos del vino, es preciso que el éter sea ácido.

BIBLIOGRAFIA

1. VARELA, G. y MOREIRAS-VARELA, O.: Influencia de un vino sobre la digestibilidad de la dieta. *Anales de Bromatología*. T-XV (1963).
2. IÑIGO, B. y BRAVO, F.: Acidez y levaduras vínicas. *Revista de Ciencia Aplicada*. n.º 91 Madrid (1963).
3. CARO BAROJA, J.: Conferencia. Cátedra del vino. Ed. Jerez Industrial. Jerez (Cádiz) (1957).
4. TREMOLIERES, J., SERVILLE, Y. y JACQUOT, R.: *Manuel Elementaire d'alimentation humaine*. Ed. E. S. F. 2.ª ed. T-II. París (1958).
5. RIBERAU-GAYON, J. et SUDRAUD, P.: Les procédés de vieillissement des vins. X Congrès International des Industries Agricoles et Alimentaires. Madrid (1954).
6. IÑIGO, B. y BRAVO, F.: Acidez y levaduras vínicas. *Revista de Ciencia Aplicada*. n.º 93 Madrid (1963).
7. OURNAL, A. et FLANAY, M.: Essais de caracterisation des vins de raisins secs. *Ann. Technol. Agric.* 1962, 11, (1), 33-34.
8. BIOL, H. et MICHEL, A.: Etude chromatographique des vins rouges issus de cépages réglamentés. *Ann. Technol. Agric.* 1962, 11, (3), 245-247.
9. RIBERAU-GAYON, P.: Différentiation des matières colorantes des raisins et des vins des cépages français et hybrides. *Académie d'Agriculture de France. Procés-verbal de la séance du 23 Déc.* 1953.
10. CALZOLARI, C. y CERMA, E.: Applicazioni dei metodi cromatografici nell'analisi dei costituenti dei prodotti alimentari. *Rassegna Chimia* n.º 1 (1961).
11. CALZOLARI, C. y FURLANI, A.: Applicazioni dei metodi cromatografici nell'analisi dei costituenti dei prodotti alimentari. Ed. Vita E Pensiero. Università Cattolica del Sacro Cuore. Nuova serie. Vol. LXIII. Milano (1957).
12. BIOL, MICHEL et FOULONNEAU: Chromatographie des matières colorantes des vins rouges. *Vignes et Vins*. n.º 113.
13. SUDRAUD, P. y et CASSIGNARD, R.: Travaux recents sur la fermentation malolactique en Bordelais. *Vignes et Vins*. n.º 80.
14. RIBERAU-GAYON, J. et SUDRAUD, P.: Etudes expérimentale de la vinification en rouge. *Chimie et Industrie*. Vol. 79 n.º 3 (1958).
15. FLANZY, C. et POUX, CH.: Application spectrophotometrique à l'étude de la casse oxydasique des vins. *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*. T-251 p. 19-10-11 (1960).
16. RIBERAU-GAYON, J. et RIBERAU-GAYON, P.: La séparation des anthocyanes des raisins. *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*. T-238 p. 2114-6 (1964).
17. RIBERAU-GAYON, J. et GARDRAT, J.: Titrage potentiométrique des anthocyanes du raisin. *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*. T-234 p. 788-90 (1956).
18. RIBERAU-GAYON, J. y PEYNAUD, E.: *Análisis de Vinos*. Ed. Aguilar. 2.ª ed. Bilbao (1962).
19. MACARULLA, J. M. y ALVAREZ DE LA VEGA, F.: Cromatografía sobre papel de aminoácidos en líquidos biológicos. Interferencia de proteínas, electrólitos y azúcares. *Rev. de Med. E. G. Navarra* 1:205 (1957).
20. *Chomatography* E. Merck A. G. Darmstadt 2.ª ed.

21. BLOCK, R. J., DURRUM, E. L. and ZWEIG, G.: Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis. Academic Press. Inc., Publishers. New York (1955).
22. JACOBS, M. B.: Food and Foods Products. Interciencia Publishers 2.^a ed. New York, pág. 178.
23. DAWSON, R. M. C., ELLIOT, D. C., ELLIOT, W. H. y JONES, K. M.: Data for Biochemical Research. At. the Clarendon Press. Oxford (1962).
24. PASKOVA, J. y MUNK, V.: A combined detecting reagent for the identification of organic acids on paper chromatograms. J. Cromatog. 4, 241, 3 (1960).
25. EIICHI, A. y TETSURO, I.: A new color reaction with potassium permanganate and bromophenol blue on thin layer chromatograms. J. Chromatog. 12 pág. 250 (1963).
26. MARTIN, S. M.: A spray reagent for identification of organic acids. In. pág. 427 (1955).
27. Primer curso de Técnicas Instrumentales de Experimentación Bioquímica. Cátedra de Bioquímica. Facultad de Farmacia. Granada (1966).
28. IÑIGO, B. y BRAVO, F.: Acidez y levaduras vínicas. Revista de Ciencia Aplicada. n.º 89 (1962).

Granada, Julio 1967.