

## Efecto de la quitina sobre variables relacionadas con la estabilidad en vino blanco

### Effect of chitin on variables related with stability in white wine

Z. Mármol, A. Fernández, G. Páez, M. Rincón,  
K. Araujo y C. Aiello

Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia, Apartado 526. Maracaibo 4001-A, estado Zulia, Venezuela.

### Resumen

Se estudió el efecto de los tratamientos con quitina obtenida a partir de conchas de camarón (*Penaeus vannamei*) sobre algunas variables relacionadas con la estabilidad del vino blanco, en comparación con tratamientos con quitina comercial y caseinato de potasio. El vino se elaboró con un mosto de uva *Vitis vinifera* var. *Malvasía* (Centro Socialista de Investigación y Desarrollo Vitivinícola, estado Zulia) utilizando *Saccharomyces cerevisiae* para la fermentación alcohólica. Se realizaron 4 tratamientos (por triplicado) agregando 0,8 g.L<sup>-1</sup> de adsorbente y manteniendo en reposo por 24 horas a 25°C. Luego, se clarificaron por centrifugación y posterior filtración con membrana y se envasaron en botellas de 0,35 L, previamente esterilizadas e identificadas, almacenándolas a 25°C durante seis (6) meses. Cada mes se tomaron muestras (tres botellas de cada tratamiento) y se analizaron determinando pH, color, acidez, polifenoles totales, catequinas y etanol. Los resultados indican que el tiempo de almacenamiento tiene efectos significativos ( $P < 0.01$ ) sobre las variables relacionadas con la estabilidad del vino blanco, aumento de pH, color y contenido de etanol y disminución de la acidez, los polifenoles totales y las catequinas. El contenido de etanol no varía producto del tratamiento, manteniéndose constante después del segundo mes de almacenamiento, obteniéndose en promedio un grado alcohólico menor que el del vino sin tratar ( $P < 0.01$ ). El contenido de polifenoles totales y de catequinas es menor en los vinos tratados, lo cual concuerda con la disminución del color, no encontrándose diferencias significativas ( $P > 0,01$ ) producto del tipo de adsorbente utilizado en el tratamiento. Estos resultados confirman que los tratamientos aplicados reducen al oscurecimiento no enzimático durante el al-

macenamiento, proporcionando la quitina obtenida de las conchas de camarón una alternativa con gran potencial comparable con el caseinato de potasio y la quitina comercial.

**Palabras clave:** vino blanco, quitina, polifenoles totales, adsorbentes.

## Abstract

The effect of treatment with chitin, obtained from shrimp shells (*Pennaeus vannamei*), on some variables related to white wine stability was studied compared to treatments with commercial chitin and potassium caseinate. The wine was made with grape must of *Vitis viniferous* var. *Malvasia* (Socialist Center of Wine Research and development, Zulia state) using *Saccharomyces cerevisiae* for alcoholic fermentation. Four (4) treatments were performed (in triplicate) by adding 0.8 g.L<sup>-1</sup> adsorbent and keeping at rest for 24 hours at 25°C. Then clarified by centrifugation and subsequent membrane filtration and bottled in glass bottles of 0.35 L, previously sterilized and identified, and stored at 25°C for six (6) months. Each month, samples (three bottles of each treatment) were taken and analyzed by determining pH, colour, acidity and content of total polyphenols, catechins and ethanol. The results indicate that the storage time has significant effects ( $P<0.01$ ) on the variables related to the stability of white wine, pH, colour and ethanol content increases, while acidity, total polyphenols and catechins decreases. The ethanol content of the treated wines remains constant after the second month of storage, yielding an average alcohol content less than the obtained for the untreated wine ( $P<0.01$ ). The content of total polyphenols and catechins in the treated wines is lower than in the wine control, producing higher colour loss. No significant differences ( $P<0.01$ ) were found by the adsorbent type used in the treatment. These results confirm that the applied treatments reduce the non-enzymatic browning during storage. The chitin obtained from shrimp shells is an alternative with great potential, comparable to potassium caseinate and commercial chitin.

**Key words:** white wine, chitin, total polyphenols, adsorbent.

## Introducción

En la elaboración de un vino blanco, el principal objetivo del vinificador es limitar al máximo los intercambios entre el mosto y las partes sólidas de la vendimia. Como el vino blanco procede únicamente del zumo de la uva, las operaciones de extracción de este zumo tienen una importancia muy especial (Flanzy, 2003).

## Introduction

The main objective of the wine maker when elaborating the wine is to limit the interchanges between the must and the solid parts of the harvest. Since the white wine only comes from the grape's juice, the extraction operation of this juice has a special importance (Flanzy, 2003). The elaboration of white wine is done

La vinificación en blanco se conduce con cuidado de evitar la disolución directa o enzimática, de los componentes del hollejo. Por lo tanto, la separación del mosto debe ser rápida y fraccionada (Peypnaud, 1977). Los fenoles presentes en los mostos de uva blanca son catequinas, fenoles no flavonoideos, flavonoles y flavononas con algunos flavan-3,4-dioles (Ough, 1996).

El oscurecimiento de los vinos producto de la oxidación no enzimática, también llamada oxidación química, está relacionado con la cantidad de compuestos fenólicos presentes (Silva Ferreira *et al.*, 2002) representando un problema importante en la estabilidad del vino blanco. La presencia de grandes cantidades de compuestos fenólicos aumenta la susceptibilidad a la oxidación, alterando el color, aroma y sabor, causando disminución de las cualidades visuales y sensoriales del vino (Silva Ferreira *et al.*, 2003, Cosme *et al.*, 2008), lo cual se traduce en pérdidas económicas por la inestabilidad del vino (Mármol *et al.*, 2009).

El alto contenido de compuestos fenólicos, principalmente flavonoles (catequinas, taninos y derivados) presentes en los vinos blancos tiene una fuerte influencia sobre el oscurecimiento durante el envejecimiento (Mayén *et al.*, 1997; Recamales *et al.*, 2006, Berradre *et al.*, 2007), por lo que se recomienda la extracción de estas sustancias para aumentar la estabilidad y reducir el potencial de oscurecimiento. Un método empleado para contrarrestar estas alteraciones es la reducción de los compuestos fenólicos a través de la adsorción por sustancias que presenten alta afinidad con los polifenoles y que

carefully with the aim of avoiding the direct or enzymatic dissolution of the skins components. Therefore, the separation of the must has to be fast and fractioned (Peypnaud, 1977). The phenols present on the must of white grapes are catechins, non-flavonoids phenols, flavonols and flavones with some flavan-3, 4-diols (Ough, 1996).

The browning of wines product of the non enzymatic oxidation, also called chemical oxidation, is related to the quantity of phenolic compounds present (Silva Ferreira *et al.*, 2002) representing an important problem in the stability of white wine. The presence of big quantities of phenolic compounds increases the susceptibility to the oxidation, altering the color, aroma, and taste, causing the reduction of the visual and sensorial qualities of the wine (Silva Ferreira *et al.*, 2003, Cosme *et al.*, 2008), which is translated in economical losses caused by the instability of the wine (Mármol *et al.*, 2009).

The high content of phenolic components, mainly flavonols (catechins, tannins and derivates) present in white wines has a strong influence on the browning during ageing (Mayén *et al.*, 1997; Recamales *et al.*, 2006, Berradre *et al.*, 2007), thus, it is recommended the extraction of these substances to increase the stability and reduce the browning potential. A method employed to counteract these alterations is the reduction of phenolic compounds through the absorption by substances with high affinity with polyphenols and that would keep the quality of the wine (Spagna *et al.*, 2000).

mantengan la calidad del vino (Spagna *et al.*, 2000).

El adsorbente comúnmente empleado en enología es el caseinato de potasio, el cual es derivado de la caseína por disolución en solución acuosa de hidróxido de potasio y secado por pulverización (Weber *et al.*, 2009), sin embargo, se ha reportado que puede causar reacciones alérgicas, por lo cual debe incluirse en las etiquetas del vino (Weber *et al.*, 2009, Cosme *et al.*, 2012). Por esta razón, es importante encontrar compuestos alternativos con igual o mejor capacidad para reducir el oscurecimiento de los vinos blancos.

Recientemente, se incluyeron en el Código Internacional de las Prácticas Enológicas (Codex Enológico Internacional, 2009) los tratamientos con quitosano y glucano-quitina de origen fúngico para la clarificación de mostos y vino. Estudios realizados presentan a la quitina como adyuvante de origen biológico capaz de interactuar con los compuestos polifenólicos del vino (Spagna *et al.*, 1996; Spagna *et al.*, 2000) disminuyendo la oxidación producto del oscurecimiento no enzimático con el tiempo (Mármol *et al.*, 2009).

La quitina es un polímero compuesto de unidades de N-acetilglucosamina (2-acetamido-2-desoxiglucosa) unidas entre sí por enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos. Es el segundo polímero más abundante en la naturaleza, después de la celulosa. Se encuentra en la pared celular de los hongos y en el exoesqueleto de los artrópodos (crustáceos, arácnidos e insectos). La producción industrial de quitina se realiza a partir de los residuos del procesamiento de crustáceos (camarón, cangrejo, entre otros), los

The absorbent commonly employed in enology is the potassium caseinate, which derives from the casein by dissolution in aqueous solution of potassium hydroxide and dry by pulverization (Weber *et al.*, 2009), however, it has been reported that it might cause allergic reaction, therefore, it must be included on the wine labels (Weber *et al.*, 2009, Cosme *et al.*, 2012). For this reason, it is important to find alternative compounds with the same or better capacity for reducing the browning of white wines.

Recently, were included on the International Code of Enological Practices (Codex Enológico Internacional, 2009) the treatments with chitosan and glucan-chitin with fungic origin for clarifying the must and wine. Researches done present the chitin as a biological adjuvant capable of interacting with the polyphenols compounds of wine (Spagna *et al.*, 1996; Spagna *et al.*, 2000) reducing the oxidation product of the non enzymatic browning with the time (Mármol *et al.*, 2009).

Chitin is a polymer composed by N-acetylglucosamine (2-acetamide-2-deoxyglucose) joined in between by links  $\beta$ -1.4 glucosidic. It is the second most abundant polymer in the nature after the cellulose. It is found on the cellular wall of fungi and on the exoskeleton of arthropods (crustacean, arachnid and insects). The industrial production of chitin is done after the processing residues of crustaceans (shrimps, crabs, among others), which have from 14 and 35% of chitin associated to the proteins, lipids, pigments and calcium. The annual worldwide

cuales contienen entre 14 y 35% de quitina asociada a las proteínas, lípidos, pigmentos y calcio. La producción mundial anual de conchas de crustáceos ha sido estimada en  $1,2 \times 10^6$  toneladas y la recuperación de la quitina y proteínas desde este tipo de residuos es una fuente adicional de ingresos (Ahmaruzzaman, 2008).

En esta investigación, se estudió el efecto del tratamiento con quitina extraída de conchas de camarón sobre algunas de las variables (pH, acidez, polifenoles totales, catequinas, color) relacionadas con la estabilidad del vino blanco, comparando el comportamiento con el causado por tratamientos con quitina comercial y caseinato de potasio.

## Materiales y métodos

### Obtención de quitina

Se emplearon conchas de camarón (*Pennaeus vannamei*) suministradas por la planta procesadora de camarones, Industrias del Mar, C. A, ubicada en el municipio San Francisco, estado Zulia, Venezuela. Las conchas de camarón se lavaron con agua fresca, se secaron a temperatura ambiente en mallas de orificios pequeños durante 72 horas. Luego se molieron en un molino de cuchillas (Thomas Wiley Laboratory Mill, modelo 4) y se pasó por un tamiz con mallas de 0,5-30 mesh (5,66- 0,60 mm) (Mármol *et al.*, 2004).

Para obtener la quitina, la harina obtenida se sometió a un proceso de desproteínización con NaOH al 1% m/v mediante una relación líquido - sólido en una proporción 11:1 durante 24 horas a 28°C y 150 rpm en un

production of crustaceans' shells has been estimated in  $1.2 \times 10^6$  tons and the recovery of chitin and proteins from this type of residues is an additional income source (Ahmaruzzaman, 2008).

On this research was studied the treatment effect with chitin extracted from shrimp shells on some of the variables (pH, acidity, total polyphenols, catechins, color) related to the stability of white wine, comparing the behavior with the one caused with commercial chitin and potassium caseinate.

## Materials and methods

### Obtaining of the chitin

Shrimp shells (*Pennaeus vannamei*) were employed provided by the shrimp procedure plant, Industrias del Mar, C.A, located on San Francisco parish, Zulia state, Venezuela. Shrimp shells were washed with clear water, let dried on environmental temperature in a small-hole mesh for 72 hours. Later, were grounded in a knife grinder (Thomas Wiley Laboratory Mill, model 4) and passed through a mill with a 0.5-3.0 mesh (5.66- 0.60mm) (Mármol *et al.*, 2004).

To get the chitin, the flour obtained was submitted through a deproteinization process with NaOH at 1% m/v with a liquid-solid relation in a 11:1 proportion for 24 hours at 28°C and 150 rpm in a rotator incubator (New Brunswick Scientific). Successive washing with distilled water were used to reach a pH 7, was filtered and the solids were let dried in a stove at 60°C. Later, these solids were submitted to a demineralization process with NCl 0.6 M in a liquid-

incubador rotatorio (New Brunswick Scientific). Se realizaron lavados sucesivos con agua destilada hasta alcanzar pH 7, se filtró y los sólidos se secaron en la estufa a 60°C. Posteriormente, estos sólidos se sometieron a un proceso de desmineralización con NCl 0,6 M en una relación líquido - sólido de 11:1 durante 3 horas a 28°C y 150 rpm. Se lavó con agua destilada para neutralizar, se filtró y la quitina sólida se secó en la estufa a 60°C (Mármol *et al.*, 2004; Young *et al.*, 1985).

### Obtención del Vino Blanco

Para la obtención del vino blanco, se utilizó mosto de uva *Vitis vinífera* var. *malvasía* proveniente del Centro Socialista de Investigación y Desarrollo Vitivinícola, estado Zulia, al cual recién prensado, se le añadió metabisulfito de sodio (0,09 g.L<sup>-1</sup>) como agente inhibidor de levaduras salvajes y bacterias acéticas, favoreciendo la implantación de la cepa activa añadida. Posteriormente se agregó bentonita como clarificante (1,0 g.L<sup>-1</sup>) con el fin de eliminar las proteínas susceptibles de provocar turbidez en el vino (Blouin y Peynaud, 2004). Se refrigeró a 4°C durante 24 a 48 h y luego se hizo desfangado, sedimentación y trasiego, eliminando las materias sólidas en suspensión.

Para la preparación del pie de cuba, el mosto de uva *Vitis vinífera* var. *Malvasía* clarificado se colocó en vasijas de fermentación, con una concentración de sólidos disueltos en el mosto de 20-22 °Brix, suplementado con 0,2 g.L<sup>-1</sup> de fosfato de amonio (FISHER, New Jersey, USA). Se inoculó con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 4921) la cual fue previamente rehidratada y activada en

solid relation of 11:1 for 3 hours at 28°C and 150 rpm. It was washed with distilled water for neutralizing it, and filtered; the solid chitin was let dried on a stove at 60°C (Mármol *et al.*, 2004; Young *et al.*, 1985).

### Obtaining of White Wine

For obtaining the white wine, a grape must was used of *Vitis vinífera* var. *malvasia* coming from the Socialist Wine Center of Research and Wine Development, located in Zulia state, which was added sodium metabisulphite (0.09 g.L<sup>-1</sup>) when pressed, as an inhibitor agent of yeast and acetic bacteria, favoring the implantation of the active added strain. Subsequently, bentonite was added as a clarifier (1.0 g.L<sup>-1</sup>) with the aim of eliminating the proteins sensitive to provoke turbidity in the wine (Blouin and Peynaud, 2004). It was refrigerated at 4°C for 24 to 48 h and later was debourbaged, sedimented and transferred, eliminating the solid matters in suspension.

For preparing the culture, the clarified grape must of *Vitis vinífera* var. *Malvasía* was put on fermentation jars with a diluted solid concentration in the grape must of 20-22 °Brix, supplementing with 0.2 g.L<sup>-1</sup> of ammonium phosphate (FISHER, New Jersey, USA). It inoculated with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 4921) which was previously rehydrated and activated on agar plates YM (Jong *et al.*, 1990) which was incubated for 24 hours at 25°C.

The clarified and supplemented must inoculated with the culture and kept at 25°C, daily measuring the °Brix with a refractometer (Abbe Baush & Lomb) for monitoring the substrate

cuñas de agar YM (Jong *et al.*, 1990) y se incubó durante 24 horas a 25°C.

El mosto clarificado y suplementado se inoculó con el pie de cuba y se mantuvo a 25°C, midiendo diariamente los °Brix con un refractómetro (Abbe Baush & Lomb) para monitorear el consumo de sustrato y la subsiguiente transformación de los azúcares en alcohol, verificando así el tiempo de finalización del proceso de fermentación y obtención del vino.

### Tratamientos del vino

El vino obtenido se colocó en botellas de 4L de capacidad con un volumen de trabajo de 2,2 L. Se realizaron 4 tratamientos por triplicado: control (sin adsorbente), caseinato de potasio, quitina comercial y quitina propia. Se añadieron 0,8 g.L<sup>-1</sup> de cada uno de los agentes adsorbentes y se dejaron en reposo por 24 horas a 25°C (Mármol *et al.*, 2009).

Los vinos se clarificaron mediante centrifugación y posterior filtración con membrana éster celulosa estéril con tamaño de poro de 0,45 µm. Luego, se envasaron en botellas de 0,35 L de capacidad, previamente esterilizadas y debidamente identificadas. El muestreo se realizó durante seis (6) meses, tomando mensualmente una muestra, por triplicado, a las cuales se les determinó pH, color, acidez, contenido de polifenoles totales, catequinas y etanol.

### Métodos de análisis

**pH:** El pH del mosto y del vino se midió con un pH-metro (Thermo Electron Corporation Orion 3 Star) con una precisión de  $\pm 0,002$ .

**Acidez total:** La acidez total se determinó según el método indicado en la Norma COVENIN 3286 (1997) el

consumption and the subsequent transformation of sugars to alcohol, thus, verifying the ending time of the fermentation process and the obtaining of the wine.

### Treatments of the wine

The obtained wine was put on bottles of 4L of capacity with a working volume of 2.2 L 4 treatments by triplicate were done: control (without absorbent), potassium caseinate, commercial chitin and own chitin. 0.8 g.L<sup>-1</sup> were added of each of the absorbing agents and were let in stand by for 24 hours at 25°C (Mármol *et al.*, 2009).

The wines were clarified using the centrifugation and posterior filtration with sterile cellulose ester membrane with a pore size of 0.45 µm. Later, were bottled in bottles of 0.35 L of capacity, previous sterilized and identified. The sampling was done for six (6) months, taking a sample monthly by triplicate, which were determined the pH, color, acidity, content of total phenols, catechins and ethanol.

### Analysis method

**pH:** the pH of the must and the wine was measured with a pH-meter (Thermo Electron Corporation Orion 3 Star) with an accuracy of  $\pm 0.002$ .

**Total acidity:** the total acidity was determined following the method indicated on the COVENIN 3286 norm (1997), which is based on the quantification of the valued free acids (tartaric, malic, succinic and lactic) expressed as the quantity of tartaric acid content on the wine sample. The assessment was done with sodium hydroxide 0.1 M, using phenolphthalein at 1% m/v as indicator.

cual se basa en la cuantificación de los ácidos libres valorables (tartárico, málico, succínico y láctico) expresados como la cantidad de ácido tartárico contenida en una muestra de vino. La valoración se realizó con hidróxido de sodio 0,1 M, utilizando fenoltaleína al 1% m/v como indicador.

**Color:** La variación del color de los vinos tratados y el vino control se determinó por colorimetría, para lo cual se tomaron 20 mL de cada muestra y se filtraron con membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  y se midió la absorbancia a 420 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Genesys 10UV) empleando como blanco agua previamente filtrada a través de la membrana (Amerine y Ough, 1976).

**Contenido de polifenoles totales:** El contenido de polifenoles totales se determinó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, con un espectrofotómetro UV-Vis (Genesys 10UV). Este método se basa en la reacción redox, en medio básico, que tiene lugar entre los compuestos fenólicos y el reactivo de Folin-Ciocalteu, siendo esta última una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdénico de color amarillo. La reacción da origen a un complejo de color azul de los óxidos de wolframio y molibdeno que tiene una absorción máxima a 765 nm. (Amerine y Ough, 1976). Las concentraciones se determinaron por medio de una curva calibración preparada usando ácido gálico a valores de concentración desde 0 a 500  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Los resultados se expresaron como mg polifenoles por litro.

**Contenido de catequinas:**

El contenido de catequinas se determinó colorimétricamente empleando un

**Color:** The color variation of the treated wines and the controlled wine was determined by colorimetry, for which were taken 20 mL of each sample and were filtered with a membrane of 0.45  $\mu\text{m}$  and the absorbance was measured at 420 nm in a spectrophotometer UV-Vis (Genesys 10UV) employing filtered water through the membrane (Amerine y Ough, 1976).

**Content of total polyphenols:** the content of total polyphenols was determined by the colorimetric method of Folin-Ciocalteu, with a spectrophotometer UV-Vis (Genesys 10UV). This method is based on the redox reaction, in a basic media, which takes place between the phenolic compounds and the Folin-Ciocalteu reactive, being the latter a mix with phosphotungstic and phosphomolybdic yellow acids. The reaction originates a blue complex of the oxides tungsten and molybdic with a maximum absorption at 765 nm (Amerine and Ough, 1976). The concentrations were determined with a calibration curve prepared using galic acid at concentration values from 0 to 500  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . The results were expressed as mg polyphenols per liter.

**Catechins content:** The catechins content was determined colorimetrically using an UV-Vis spectrophotometer (Genesys 10UV). This method is based on the reaction of catechins (active polyphenols) with vainillin (Amerine and Ough, 1976). Vainillin is an aldehyde which is relatively steady at high acids concentrations, which when reacting with 6 and 7 of the flavanol originates a red complex which maximum



espectrofotómetro UV-Vis (Genesys 10UV). Este método se basa en la reacción de las catequinas (polifenoles reactivos) con la vainillina (Amerine y Ough, 1976). La vainillina es un aldehído que es relativamente estable a altas concentraciones de ácido que al reaccionar con los sitios 6 y 8 de los flavanos origina un complejo de color rojo cuya máxima absorbancia se determina a 500 nm. Las concentraciones se determinaron por medio de una curva de calibración preparada de forma similar con catequina entre 0 y 100 mg.L<sup>-1</sup>. Los resultados se expresaron como mg de catequinas por litro.

**Contenido de Etanol:** La concentración de etanol se determinó por Cromatografía de Gas, utilizando un equipo Agilent 6890N provisto de detector de ionización a la llama (FID) e inyector automático de muestras (Agilent 7683B). Se empleó una columna HP-5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm de espesor de película) con temperatura inicial de 150°C, aumentando hasta 200°C por 2 minutos. Se utilizó etanol como estándar y helio como gas de arrastre, con temperaturas del detector y del inyector de 220 y 280°C, respectivamente.

### Diseño estadístico experimental

El experimento se realizó bajo un diseño factorial de dos factores, con una disposición factorial del tiempo de almacenamiento como factor A y tipo de adsorbente como factor B para cada una de las variables: catequinas, polifenoles, color, pH, acidez y etanol.

## Resultados y discusión

La caracterización del mosto inicial se presenta en el cuadro 1. El pH

absorbance is determined at 500 nm. The concentrations were determined with a calibration curve prepared similarly with catechins from 0 to 100 mg.L<sup>-1</sup>. The results were expressed as mg of catechins per liter.

**Ethanol content:** The ethanol concentration was determined by Gas Chromatography, using an Agilent equipment 6890N with a flame ionization detector (FID) and automatic sample injector (Agilent 7683B). A HP-5 column (30 m x 0.32 mm x 0.25 µm of the film's thickness) with initial temperature of 150°C, increasing until 200°C per 2 minutes. Ethanol was used as standard and helium as carrier gas, with temperatures of the detector and injector of 220 and 280°C respectively.

### Statistical experimental design

The experiment was done with a 2-split plot block design, with a storing time disposition of blocks as factor A and absorbent type as factor B, for each of the variables: catechins, polyphenols, color, pH, acidity and ethanol.

## Results and discussion

The characterization of the initial must is presented on table 1. The pH (3.621±0.007) and acidity (6.00±0.01 g.L<sup>-1</sup> of tartaric acid) correspond to the values reported for musts of dessert wine (Amerine and Ough, 1976). °Brix (21.30±0.17) indicate a quantity of fermented sugar present on the grape's must, which are sufficient for obtaining a good alcoholic level, without the need of chaptalizing (Amerine and Ough, 1976). The must presents a total

**Cuadro 1. Caracterización del mosto inicial (Uva *Vitis vinifera* var. *Malvasía*).****Table 1. Characterization of the initial must (grape *Vitis vinifera* var. *Malvasía*).**

Parámetros	Valores $\pm$ DE *
pH	3,62 $\pm$ 0,01
Color (absorbancia 420 nm)	0,139 $\pm$ 0,002
Polifenoles totales (mg.L <sup>-1</sup> )	318,1 $\pm$ 0,7
Catequinas (mg.L <sup>-1</sup> )	17,1 $\pm$ 0,1
Acidez (g ácido tartárico L <sup>-1</sup> )	6,00 $\pm$ 0,01
°Brix	21,30 $\pm$ 0,17

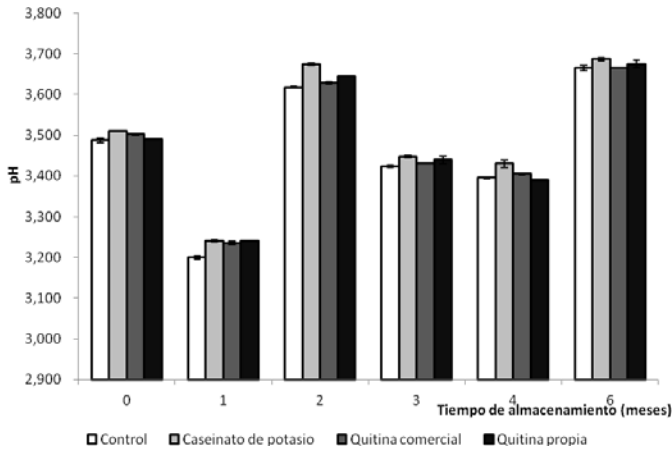
\*Valores promedios de tres replicas. DE: Desviación estándar

(3,621 $\pm$ 0,007) y la acidez (6,00 $\pm$ 0,01 g L<sup>-1</sup> de ácido tartárico) se corresponden con valores reportados para mosto de vino de postre (Amerine y Ough, 1976). Los °Brix (21,30 $\pm$ 0,17) indican una cantidad de azúcares fermentables presentes en el mosto de uva suficientes para obtener un buen nivel alcohólico, sin necesidad de chaptalizar (Amerine y Ough, 1976). Presenta un contenido de polifenoles totales (318,1 $\pm$ 0,7) y catequinas (17,1 $\pm$ 0,1) que podrían aumentar las reacciones de polimerización para formar procianidinas y taninos causando amargura, propiedades de astringencia y alteraciones en el color. Es importante destacar que en vinos blancos se debe evitar cualquier oxidación en cuanto se tenga materia polifenólica susceptible de oxidarse (Macías *et al.*, 2002).

En la figura 1 se muestra la variación del pH de los vinos durante el almacenamiento. Se observa que el pH tiene un comportamiento similar en todos los vinos (no tratado o control y

polyphenol content (318.1 $\pm$ 0.7) and catechins (17.1 $\pm$ 0.1) which may increase the polymerization reaction to form procyanidins and tannins causing bitterness, astringency properties and alterations in the color. It is important to mention that in white wines have to be avoided any kind of oxidation regarding when having polyphenolic matter sensitive to oxidize (Macías *et al.*, 2002).

In figure 1 is shown the variation of the pH in wines during storing. It is observed that the pH has a similar behavior in all wines (untreated or controlled and treated with absorbent) throughout the storing time, observing fluctuations, and obtaining the maximum values on the sixth month. The statistical analysis for a significance level of 1% showed a significant effect of the storing time on the pH of wines. None significant differences were found ( $P > 0.01$ ) between the pH values of treated wines and among these and the ones obtained for untreated wine (table 2. In avera-



**Figura 1. Comportamiento del pH de los vinos tratados con adsorbentes y el vino sin tratar (control) durante el tiempo de almacenamiento (Los valores graficados son promedios de tres replicas, barras de error  $\pm 1$  desviación estándar).**

**Figure 1. pH behavior of wines treated with adsorbents and untreated wine (control) during the storing time (The plotted values are the averages of the replications, error bars  $\pm 1$  standard deviation).**

tratados con adsorbente) a lo largo del tiempo de almacenamiento, observándose fluctuaciones, obteniéndose los valores máximos al sexto mes. El análisis estadístico, para un nivel de significancia de 1%, mostró un efecto significativo del tiempo de almacenamiento sobre el pH de los vinos. No se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.01$ ) entre los valores del pH de los vinos tratados, ni entre estos y los obtenidos para el vino no tratado (cuadro 2). En promedio, el pH a los seis meses de almacenamiento fue de  $3,68 \pm 0,01$ , valor este comparable con los reportados en la literatura (Amerine y Ough, 1976; Carazola y Xirau, 2005; COVENIN, 1997; Dominique *et al.*, 2003, Fernández *et al.*, 2009).

ge, the pH within six months of storage was of  $3.68 \pm 0.01$ , comparable value to those reported in the literature (Amerine and Ough, 1976; Carazola and Xirau, 2005; COVENIN, 1997; Dominique *et al.* 2003, Fernández *et al.*, 2009).

The acidity behavior of treated wines and the controlled wine is shown on figure 2. In general, is observed that the acidity reduced with the storing time, obtaining statistical significant differences ( $P < 0.01$ ) between the observed values to the different tomes studied for each of the wines. The highest variations of the acidity values among untreated and treated wines with the different adsorbents were registered between the times of 0 and 1 month, however, after

**Cuadro 2. Valores promedio de las propiedades del vino tratado con adsorbentes y del vino sin tratar luego de seis meses de almacenamiento a 25°C.**

**Table 2. Average values of the wine properties treated with absorbents and untreated wine after six month of storing at 25°C.**

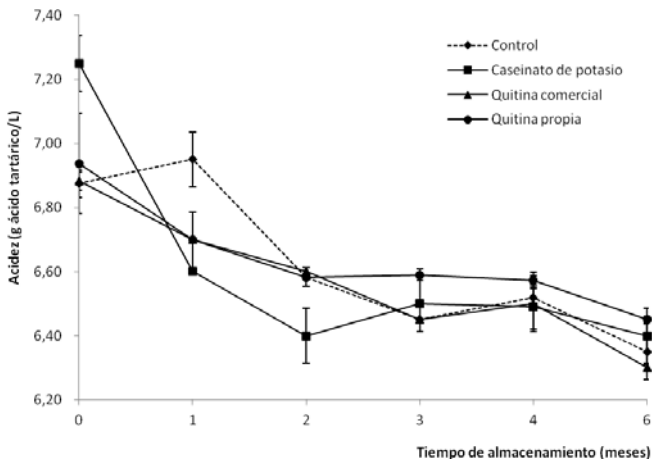
Parámetros	Vino no tratado (Control)	Tipo de adsorbente utilizado en el tratamiento		
		Caseinato de potasio	Quitina comercial	Quitina propia
pH	3,67±0,01 <sup>a</sup>	3,69±0,00 <sup>a</sup>	3,67±0,00 <sup>a</sup>	3,68±0,01 <sup>a</sup>
Acidez (g ácido tartárico L <sup>-1</sup> )	6,35±0,09 <sup>a</sup>	6,40±0,09 <sup>a</sup>	6,30±0,01 <sup>a</sup>	6,45±0,01 <sup>a</sup>
Etanol (g.L <sup>-1</sup> )	103,95±0,57 <sup>a</sup>	101,19±0,43 <sup>b</sup>	101,34±1,74 <sup>b</sup>	101,38±0,67 <sup>b</sup>
Polifenoles Totales (mg L <sup>-1</sup> )	198,32±0,48 <sup>a</sup>	176,93±0,58 <sup>b</sup>	177,33±0,46 <sup>b</sup>	181,33±0,64 <sup>b</sup>
Catequinas (mg L <sup>-1</sup> )	1,469±0,017 <sup>a</sup>	0,963±0,018 <sup>b</sup>	1,060±0,137 <sup>b</sup>	0,899±0,097 <sup>b</sup>
Color (Absorbancia a 420 nm)	0,198±0,006 <sup>a</sup>	0,175±0,002 <sup>b</sup>	0,181±0,001 <sup>b</sup>	0,179±0,002 <sup>b</sup>

Nota: Los valores de cada parámetro corresponden al promedio de tres replicas ± desviación estándar. Letras diferentes en los valores de una misma fila indican diferencias significativas a P<0,01.

El comportamiento de la acidez de los vinos tratados y el vino control se muestra en la figura 2. En general, se observa que la acidez disminuyó con el tiempo de almacenamiento, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.01$ ) entre los valores observados a los diferentes tiempos estudiados para cada uno de los vinos. La mayor variación de los valores de acidez entre los vinos, sin tratar y tratados con los diferentes adsorbentes, se registraron entre las medias de los tiempos 0 y 1 mes, sin embargo, a partir de los 2 meses de almacenamiento las diferencias se redujeron. Los menores valores de acidez se obtuvieron a los 6 meses de almacenamiento (cuadro 2), no encontrándose diferencias significativas ( $P > 0.01$ ) entre los valores encontrados

2 month of storing the differences reduced (table 2), without significant differences ( $P > 0.01$ ) between the values found for untreated and treated wine  $6.35 \pm 0.09$  g tartaric acid  $L^{-1}$ , treated with potassium caseinate ( $6.40 \pm 0.09$  g tartaric acid  $L^{-1}$ ), with commercial chitin ( $6.30 \pm 0.01$  g tartaric acid  $L^{-1}$ ) and with the own chitin ( $6.45 \pm 0.01$  g tartaric acid  $L^{-1}$ ). These values are close to the rank established as criteria for table wines of  $7.0 - 9.0$  g tartaric acid  $L^{-1}$  (Amerine and Ough, 1976) and according to the required by the COVENIN 3342 norm (1997) which indicated a minimum of  $4.0$  g tartaric acid  $L^{-1}$  for wines.

The ethanol content in wines treated with absorbents and untreated wines in the different storing times are shown on figure 3. It is observed that



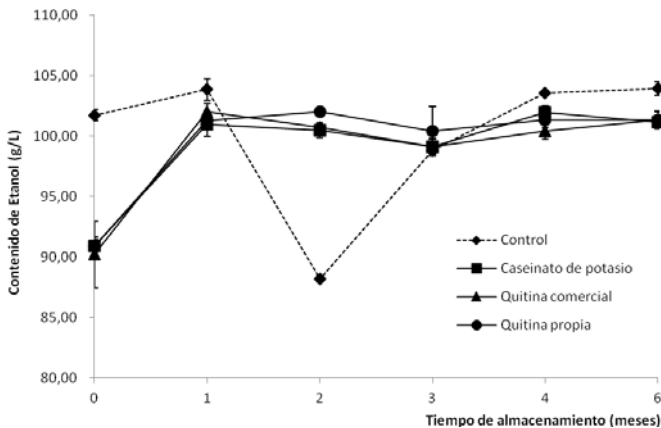
**Figura 2.** Comportamiento de la acidez de los vinos tratados y el vino sin tratar (control) durante el tiempo de almacenamiento (Los valores graficados son promedios de tres replicas, con las barras de error con  $\pm 1$  desviación estándar).

**Figure 2.** Acidity behavior of treated and untreated wines (control) during the storing time (The plotted values are the averages of the replications, error bars  $\pm 1$  standard deviation).

para el vino sin tratar o control ( $6,35 \pm 0,09$  g ácido tartárico  $L^{-1}$ ), tratado con caseinato de potasio ( $6,40 \pm 0,09$  g ácido tartárico  $L^{-1}$ ), con quitina comercial ( $6,30 \pm 0,01$  g ácido tartárico  $L^{-1}$ ) y con la quitina propia ( $6,45 \pm 0,01$  g ácido tartárico  $L^{-1}$ ). Estos valores son cercanos al rango establecido como criterio para los vinos secos de mesa, de  $7,0 - 9,0$  g ácido tartárico  $L^{-1}$  (Amerine y Ough, 1976) y acorde con lo requerido por la Norma COVENIN 3342 (1997) que indica un mínimo de  $4,0$  g ácido tartárico  $L^{-1}$  para vinos.

El contenido de etanol en los vinos tratados con adsorbentes y sin tratar a los diferentes tiempos de almacenamiento se presenta en la figura 3. Se observa que para los vinos tratados el contenido de alcohol aumenta al primer mes y luego tiende a estabilizarse,

for treated wines, the alcohol content increased in the first month and later tends to stabilize, and none significant differences ( $P > 0.01$ ) were found between the values obtained between the second and sixth month of storing. Likewise, none significant differences ( $P > 0.01$ ) were found between the alcohol content obtained for treated wines, indicating that the studied absorbents (potassium caseinate, commercial chitin and chitin extracted from shrimp shells) have the same effect on the alcohol content of white wine during the evaluated storing time. The alcohol content of the untreated wine had a different behavior than the wine treated with absorbents, observing a slightly increment (2%) on the first storing month, followed by a reduction (15%). This reduction might had been



**Figura 3. Contenido de etanol en los vinos tratados y el vino sin tratar (control) durante el tiempo de almacenamiento (Los valores graficados son promedios de tres replicas, con las barras de error con  $\pm 1$  desviación estándar).**

**Figure 3. Ethanol content on treated and untreated wines (control) during the storing time (The plotted values are the averages of the replications, error bars  $\pm 1$  standard deviation).**

no encontrándose diferencias significativas ( $P>0.01$ ) entre los valores obtenidos entre el segundo y sexto mes de almacenamiento. De igual forma, para todos los tiempos estudiados, no se encontraron diferencias significativas ( $P>0.01$ ) entre el contenido de alcohol obtenido para los vinos tratados, indicando que los adsorbentes estudiados (caseinato de potasio, quitina comercial y quitina extraída de conchas de camarón) ejercen el mismo efecto sobre el contenido de alcohol del vino blanco durante el tiempo de almacenamiento evaluado. El contenido de alcohol del vino no tratado tuvo un comportamiento diferente al de los vinos tratados con adsorbentes, observándose un ligero aumento (2%) al primer mes de almacenamiento, seguido de una disminución (15%). Esta disminución, quizás pudo ser causada por la degradación del etanol a ácido acético (Amerine y Ough, 1976, Alvarado y Silva, 2005). Luego, al tercer mes se observa que el contenido de alcohol comienza a incrementar hasta estabilizarse a partir del cuarto mes. El análisis estadístico mostró diferencias significativas ( $P<0.01$ ) entre los valores obtenidos para el vino sin tratar y los de los vinos tratados, indicando que el uso de adsorbentes ejerce un efecto estabilizante sobre el contenido de alcohol durante el almacenamiento.

El contenido promedio de etanol de los vinos tratados a los seis meses de almacenamiento fue de  $101,31\pm 0,10$  g.L<sup>-1</sup> mientras que para el vino no tratado fue de  $103,95\pm 0,57$  g.L<sup>-1</sup>, lo cual corresponde a grados alcohólicos de  $12,66\pm 0,10$  y  $12,99\pm 0,07\%$ , respectivamente. Estos valores se en-

caused by the degradation of the ethanol to acetic acid (Amerine and Ough, 1976, Alvarado and Silva, 2005). Later, on the third month is observed that the alcohol content starts to increase until stabilizing after the fourth month. The statistical analysis showed significant differences ( $P<0.01$ ) between the values obtained for the untreated wines and the treated wines, indicating that the use of absorbents has a stabilizing effect on the alcohol content during storing.

The average content of ethanol of treated wines in six months of storing was of  $101.31\pm 0.10$  g.L<sup>-1</sup> while for untreated wine was of  $103.95\pm 0.57$  g.L<sup>-1</sup> which corresponds to alcoholic degrees of  $12.66\pm 0.10$  and  $12.99\pm 0.07\%$ , respectively. These values are on the established rank for the COVENIN Norm (1997) (min. 7 - max. 14 of tolerance in the label  $\pm 0.5$  alcoholic degrees) for alcoholic beverages called grape wine. This parameter is important since wines are quoted and commercialized in function to their alcoholic degree (Carazola and Xirau, 2005). Besides, it is important to know the ethanol concentration since it is related to the sensorial properties that define the quality of wines (Amerine and Ough, 1976).

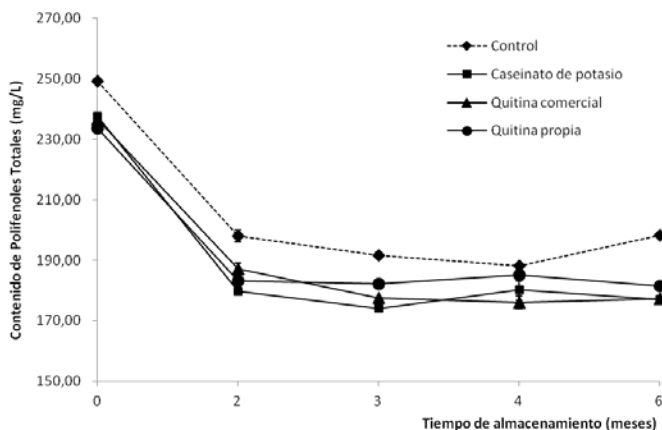
The total polyphenols content in treated and untreated wines is shown on figure 4. It is observed that for both the treated and untreated wines used as controlled, the total polyphenols content reduces with the storing time, being higher for the untreated wine than for treated wines ( $P<0.05$ ), indicating the effects of the absorbents on the stabilization of polyphenols.

cuentran dentro del rango establecido por la Norma COVENIN 3342 (1997) (min. 7 - máx. 14 de tolerancia en etiqueta  $\pm 0,5$  grados alcohólicos) para bebidas alcohólicas denominadas como vino de uvas. Este parámetro es importante ya que los vinos se cotizan y comercializan en función de su grado alcohólico (Carazola y Xirau, 2005). Además, es importante conocer la concentración de etanol ya que está relacionada con las propiedades sensoriales que definen la calidad de los vinos (Amerine y Ough, 1976).

El contenido de polifenoles totales en los vinos tratados y sin tratar se presenta en la figura 4. Se observa que tanto en los vinos tratados como en el vino no tratado, usado como control, el contenido de polifenoles totales

Chitin has affinity towards the phenolic compounds (Mármol *et al.*, 2009) and provides a stabilization of polyphenols (Spagna *et al.*, 1996). In treated wines, was found that during the storing, the absorbent type used did not have significant effects on the content of polyphenols.

In figure 5 is shown the catechins content in wines treated with absorbents and untreated wines used as control during storing, observing that in all the cases, the catechins content reduces with the storing time ( $P < 0.01$ ). The highest reduction is observed on the first storing month. This reduction might had been caused by polymerization reactions of catechins by the products resulting from the oxidation of the compounds



**Figura 4.** Contenido de polifenoles totales en los vinos tratados y el vino sin tratar (control) durante el tiempo de almacenamiento (Los valores graficados son promedios de tres replicas, con las barras de error con  $\pm 1$  desviación estándar).

**Figure 4.** Total polyphenol content on treated and untreated wines (control) during the storing time (The plotted values are the averages of the replications, error bars  $\pm 1$  standard deviation).

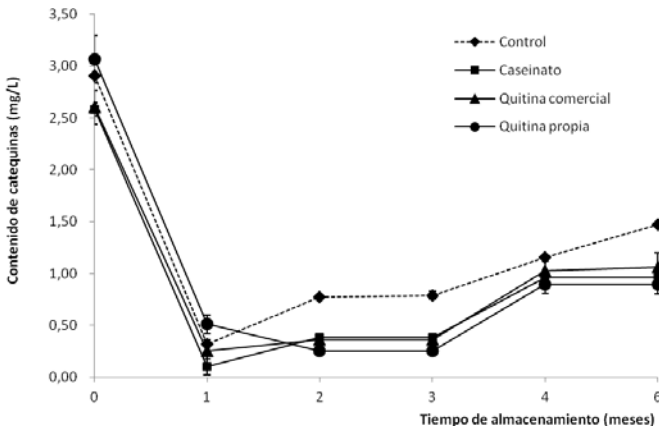


disminuye con el tiempo de almacenamiento, siendo mayor para el vino sin tratar que para los vinos tratados ( $P < 0.05$ ), indicando el efecto que los adsorbentes utilizados producen en la estabilización de los polifenoles. La quitina presenta afinidad hacia los compuestos fenólicos (Mármol *et al.*, 2009) y proporciona una estabilización de los polifenoles (Spagna *et al.*, 1996). En los vinos tratados, se encontró que durante de almacenamiento, el tipo de adsorbente utilizado no tuvo efectos significativos ( $P > 0.01$ ) sobre el contenido de polifenoles.

En la figura 5 se muestra el contenido de catequinas en los vinos tratados con adsorbentes y el vino no tratado usado como control, durante el almacenamiento, observándose que en todos los casos el contenido de catequinas disminuye con el tiempo de

such as tartaric acid and ethanol (Flanzy, 2003, Riberau *et al.*, 2006). These mechanisms require the presence of oxygen, thus, the reactions might had occurred when the wine was in contact to the air.

In treated wines is observed that the catechins content stabilizes after the second and third storing month and on the fourth month increases keeping steady until the sixth month, without significant differences ( $P > 0.01$ ) between the values product of the type of the absorbent used (table 2), reaching a final average value of  $0.97 \pm 0.08 \text{ mg.L}^{-1}$ . In the case of the untreated wine (control) the behavior is similar, however, the catechins content continuous increasing after the third and sixth storing month, obtaining an average final value higher ( $P < 0.01$ ) than treated wines



**Figura 5.** Contenido de catequinas en los vinos tratados y el vino sin tratar (control) durante el tiempo de almacenamiento (Los valores graficados son promedios de tres replicas, con las barras de error con  $\pm 1$  desviación estándar).

**Figure 5.** Catechins content on treated and untreated wines (control) during the storing time (The plotted values are the averages of the replications, error bars  $\pm 1$  standard deviation).

almacenamiento ( $P < 0.01$ ). La mayor disminución se observa al primer mes de almacenamiento. Esta disminución pudo ser causada por reacciones de polimerización de las catequinas por medio de los productos resultantes de la oxidación de compuestos como el ácido tartárico y el etanol (Flanzy, 2003, Riberau *et al.*, 2006). Estos mecanismos requieren de la presencia de oxígeno, por lo que las reacciones pudieron ocurrir cuando el vino entro en contacto con el aire.

En los vinos tratados se observa que el contenido de catequinas se estabiliza entre el segundo y tercer mes de almacenamiento y luego al cuarto mes aumenta permaneciendo estable hasta el sexto mes, no encontrándose diferencias significativas ( $P > 0.01$ ) entre los valores producto del tipo de adsorbente utilizado (cuadro 2), alcanzando un valor promedio final de  $0,97 \pm 0,08$  mg.L<sup>-1</sup>. En el caso del vino no tratado (control) el comportamiento es similar, sin embargo, el contenido de catequinas continua aumentando entre el tercer y sexto mes de almacenamiento, obteniéndose un valor promedio final mayor ( $P < 0.01$ ) al de los vinos tratados de  $1,47 \pm 0,02$  mg.L<sup>-1</sup>, indicando la efectividad de los adsorbentes en la reducción de estos compuestos.

En la figura 6 se muestra el comportamiento del color de los vinos durante el almacenamiento, observándose en todos los casos, que el almacenamiento causó un aumento en el color del vino. El color, medido como absorbancia a 420 nm, fue mayor para el vino no tratado ( $0,198 \pm 0,001$ ) que para los vinos tratados con adsorbentes ( $P < 0.01$ ). No se observaron diferencias significativas ( $P > 0.01$ ) entre el color de

$1.47 \pm 0.02$  mg.L<sup>-1</sup>, indicating the effectiveness of the adsorbents in the reduction of these compounds.

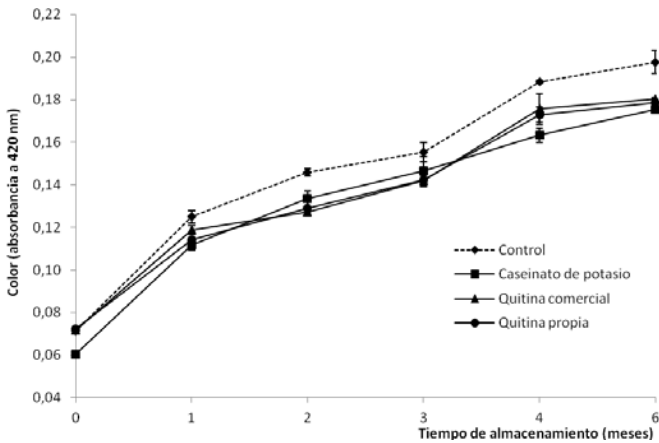
In figure 6 is shown the color behavior of wines during storing, observing in all the cases that the storage caused an increment in the color of the wine. The color, measured as absorbance at 420 nm, was higher for untreated wine ( $0.198 \pm 0.001$ ) than for wines treated with adsorbents ( $p < 0.01$ ). None significant differences ( $P > 0.01$ ) were found between the color of wines treated with commercial chitin, own chitin and potassium caseinate (average absorbance of  $0.178 \pm 0.003$ ), which corresponds to the observed for the catechins content.

The browning product of the non enzymatic oxidation of wines is related to the oxidation of the phenolic compounds, mainly the flavonoids, specifically the anthocyanins and flavonols (Li *et al.*, 2008). Wines with lower concentration of catechins presented the lowest intensity of color, due to the catechins are extremely related to the yellow color in white wines, which is produced by the presence of tannins, which are polymerized catechins, epicatechins and leucocianidinas (Oberholster, 2003).

## Conclusions

The storing time has a significant effect on the variables related to the stability of white wine, the pH, the color; and the ethanol content increases while the acidity, the total polyphenols content and the catechins content reduce.

The evaluated adsorbents (potassium caseinate, commercial



**Figura 6. Comportamiento del color de los vinos tratados y el vino sin tratar (control) durante el tiempo de almacenamiento (Los valores graficados son promedios de tres replicas, con las barras de error con 1 desviación estándar).**

**Figure 6. Color behavior on treated and untreated wines (control) during the storing time (The plotted values are the averages of the replications, error bars  $\pm$  1 standard deviation).**

los vinos tratados con quitina comercial, quitina propia y caseinato de potasio (absorbancia promedio de  $0,178 \pm 0,003$ ), lo cual se corresponde con lo observado para el contenido de catequinas.

El oscurecimiento producto de la oxidación no enzimática de los vinos está asociado con la oxidación de los compuestos fenólicos, principalmente de los flavonoides, específicamente Antocianos y flavonoles. (Li *et al.*, 2008). Los vinos con menor concentración de catequinas, presentaran menor intensidad de color, debido a que las catequinas están íntimamente relacionadas con el color amarillo en los vinos blancos, el cual es producido por la presencia de taninos, los cuales son catequinas polimerizadas, epicatequinas y leucocianidinas (Oberholster, 2003).

chitin and own chitin obtained after shrimp shells) in the treatment of white wine have a stabilizing effect on the ethanol content and reduce the content of total polyphenols and catechins, reducing the color of white wine produced after the grape variety *malvasía*.

The results indicate that the chitin obtained from shrimp shells is a potential alternative for stabilizing the properties of white wine, with a chance of substituting the use of potassium caseinate and the commercial chitin, since the chitin obtained from the shrimp shells allows reducing the phenolic compounds with the same effectiveness.

*End of english version*

## Conclusiones

El tiempo de almacenamiento tiene un efecto significativo sobre las variables relacionadas con la estabilidad del vino blanco, el pH, el color y el contenido de etanol aumentan, mientras que la acidez, el contenido de polifenoles totales y el contenido de catequinas disminuyen.

Los adsorbentes evaluados (caseinato de potasio, quitina comercial y quitina propia, obtenida a partir de conchas de camarón), en el tratamiento del vino blanco ejercen un efecto estabilizante sobre el contenido de etanol y reducen el contenido de polifenoles totales y catequinas, disminuyendo el color del vino blanco producido a partir de la variedad de uva *malvasía*.

Los resultados indican que la quitina obtenida de las conchas de camarón, resulta una alternativa con gran potencial para la estabilización de las propiedades del vino blanco, pudiendo sustituir el uso del caseinato de potasio y de la quitina comercial, ya que permite reducir los compuestos fenólicos con la misma efectividad.

## Literatura citada

Ahmaruzzaman, M. 2008. Adsorption of phenolic compounds on low cost adsorbents: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 143: 48-167.

Alvarado R. y N.Silva. 2005 Efecto del tratamiento térmico del mosto en la oxidación de vinos blancos. Universidad del Zulia. Facultad de Ingeniería. Maracaibo, Venezuela. Trabajo de Grado, 87pp.

Amerine, M.A. y C.S. Ough. 1976. Análisis de vinos y mostos. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 158p.

Berradre, M., G. Páez, E. Ramones, Z. Mármol y J. Ferrer. 2007. Control de oxidación de vinos blancos obtenidos bajo condiciones tropicales. *Rev. Fac. Agronomía*, 24:133-153.

Blouin, J. y E. Peynaud. 2004. *Enología Práctica. Conocimiento y elaboración del vino*. Cuarta edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 353 pp.

Carazola, J. y M. Xirau. 2005. Técnicas usuales de análisis en enología. *Panreac Química*. Barcelona, España. 113 pp.

Codex Enológico Internacional. 2009. Organización Internacional de la Viña y el Vino, OIV. Código Internacional de Prácticas Enológicas. Resoluciones OIV/OENO Enología 2009: 336A a 339B-367-368. Disponible en <http://www.enologo.com>.

COVENIN. 1997. Comisión venezolana de normas industriales. Norma 3286. Vinos y sus derivados. Determinación de acidez total y acidez volátil.

COVENIN. 1997. Comisión venezolana de normas industriales. Norma 3342. Vinos y sus derivados. Requisitos.

Cosme F., J.M. Ricardo-da-Silva and O. Laureano. 2008. Interactions between protein fining agents and proanthocyanidins in white wine. *Food Chemistry* 106:536-544.

Cosme F., I. Capao, L. Filipe-Ribeiro, R.N. Bennet y A. Mendes-Faia. 2012. Evaluating potential alternatives to potassium caseinate for white fining: Effects on physicochemical and sensory Characteristics. *LWT-Food Science and Technology*, 46: 382-387.

Dominique, M., C. Maillard y D. Maisondieu. 2003. El Vino del análisis a la elaboración. Editorial Acribia. S.A. España. 224 pp.

Fernández V., M. Berradre, B. Sulbarán, G. Ojeda de Rodríguez y J. Peña. 2009. Caracterización química y contenido mineral en vinos comerciales venezolanos. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 26 (3): 382-397.

- Flanzy, C. 2003. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Segunda Edición. A. Madrid Vicente Ediciones y Ediciones Mundiprensa. 782 pp.
- Jong, S.C. y M.I. Edward. 1990. *Catalogue of Yeasts*. Eighteenth edition. Rockville Maryland. 230 pp.
- Li H., A. Guo and H. Wang. 2008. Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry* 108: 1-13.
- Macías, C., P. Rodríguez and P., X. Canals. 2002. Optimización del uso de PVPP en vinos blancos. *ACE Revista de Enología*, 18:326-333 Disponible en: <http://www.acenologia.com/innovacion58.htm>.
- Mármol, Z.; E. Gutiérrez, G. Páez, J. Ferrer y M. Rincón. 2004. Desacetilación termoalcalina de quitina de conchas de camarón. *Multiciencias*, 4(2) ISSN 1317-2255. Disponible en línea en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=90440203>
- Mármol Z., J. Cardozo, S. Carrasquero, G. Páez, C. Chandler, K. Araujo y M. Rincón. 2009. Evaluación de polifenoles totales en vino blanco tratado con quitina. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 26: 423-442.
- Mayén M., R. Barón, J. Mérida and M. Medina. 1997. Changes in phenolic compounds during accelerated in white wines from *cv. Pedro Ximenez* and *cv. Baladi* grape. *Food Chemistry*, 58 (1-2): 89-95.
- Oberholster, A. 2003. Effect of viticultural and winemaking practices on the phenolic composition on grapes and wine. Part II, *Wynland* magazine. Disponible en línea en: [http://www.wineland.co.za/index.php?option=com\\_zine&view=issue&id=143%3AApril-2003&Itemid=10](http://www.wineland.co.za/index.php?option=com_zine&view=issue&id=143%3AApril-2003&Itemid=10).
- Ough, C.S. 1996. *Tratado básico de Enología*. Editorial Acribia, S.A. España. 294p.
- Peynaud, E. 1977. *Enología Práctica, Conocimiento y Elaboración del Vino*. Ediciones Mundi Prensa. Madrid. España. p. 1-414.
- Recamales A. F., A. Sayago, M.L. González-Miret, D. Hernanz. 2006. The effect of time and storage conditions on the phenolic composition and color of white wine. *Food Research International*, 39: 220-229.
- Ribéreau-Gayon P., D. Dubourdieu, B. Donèche and A. Lonvaud. 2006. *Handbook of Enology. The chemistry of wine stabilization and treatments*. John Wiley and Sons Editors. England, Volume 2. p. 144, 174, 199-201.
- Silva Ferreira A. C., P. Guedes de Pinto, P. Rodríguez, T. Hogg. 2002. Kinetics of oxidative degradation of white wines and how they are affected by selected technological parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (21): 5919-5924.
- Silva Ferreira A.C., C. Oliveira, T. Hogg, P. Guedes de Pinto. 2003. Relationship between potentiometric measurements, sensorial analysis and some substances responsible for aroma degradation of white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (16): 4668-4672.
- Spagna, G., P.G. Pifferi, C. Rangoni, F. Mattivi, G. Nicolini and R. Palmonari. 1996. The stabilization of white wines by adsorption of phenolic compounds on chitin and chitosan. *Food Research International*, 29 (3-4): 241-248.
- Spagna, G., R. Barbagallo and P.G. Pifferi. 2000. Fining treatments of white wines by means of polymeric adjuvants for their stabilization against browning. *J. Agric. Food. Chem.*, 48 (10): 4619-4627.
- Weber P., H. Steinhart and A. Paschke A. 2009. Determination of the bovine food allergen casein in white wines by quantitative indirect ELISA, SDS-PAGE western blot and immunostaining. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 8399-8405
- Young, M., R. Bell and P. Carroad. 1985. "Kinetics of chitinase production II. Relationship between bacterial growth, chitin hydrolysis and enzyme synthesis". *Biotechnology and Bioengineering*, 27, 776-780.