



TRABAJO FIN DE MÁSTER.

MÁSTER EN TECNOLOGÍA E INDUSTRIA ALIMENTARIA.

***Estabilización del color de vinos tintos de clima cálido (variedad Syrah)
por adición de subproductos vitícolas. Semillas de uvas pasas de
variedad Pedro Ximénez***



Alba María Fernández Briantes

Sevilla, Noviembre de 2016

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR. UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

FACULTAD DE FARMACIA. UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

***Estabilización del color de vinos tintos de clima cálido (variedad Syrah)
por adición de subproductos vitícolas. Semillas de uvas pasas de
variedad Pedro Ximénez***

Realizado por D^a Alba María Fernández Briantes, que opta al título de Máster Universitario en Tecnología e Industria Alimentaria, en el Departamento de Nutrición y Bromatología Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla, durante 2015-2016. Dirigido por los Dres. Francisco José Heredia Mira y María Lourdes González-Miret Martín.

Fdo.: Los Tutores:

Dr. Francisco José Heredia Mira Dra. M^a Lourdes González-Miret Martín

Sevilla, Noviembre de 2016

ÍNDICE:

RESUMEN	7
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. La vid	11
1.2. El color del vino	12
1.3. Transferencia de color al vino.....	16
1.4. Equilibrio de los antocianos del vino.....	19
1.5. El color y su medida	22
1.5.1.El color.....	22
1.5.2.Instrumentación colorimétrica	23
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Descripción de los ensayos	30
3.2. Determinaciones enológicas.....	30
3.2.1.Anhídrido sulfuroso total	30
3.2.2.pH	31
3.2.3.Acidez Total	31
3.2.4.Acidez Volátil	32
3.3. Determinación del color por espectrofotometría	32
3.4. Determinación espectrofotométrica del porcentaje de antocianos copigmentados y pigmentos poliméricos.....	33
3.5. Determinación del contenido de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu	34
3.6. Determinación de flavanoles en muestra de vino mediante el método del p-dimetilaminocinamaldehído (DMACA)	35
3.7. Determinación de antocianos en vino por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	36

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1. Parámetros enológicos	39
4.2. Compuestos fenólicos	39
4.2.1. Fenoles totales	39
4.2.2. Identificación y cuantificación de antocianos	41
4.2.3. Flavanoles	51
4.2.4. Copigmentación	52
4.3. Estudio colorimétrico	56
4.4. Tratamiento estadístico de los resultados	66
5. CONCLUSIONES	71
6. BIBLIOGRAFÍA	73

RESUMEN

Los cambios que se producen en la uva durante la maduración en climas cálidos, como es el caso de Andalucía, provocan un apreciable desfase entre la madurez fenólica y la tecnológica. Este desequilibrio conduce a la obtención de uvas con alto grado en azúcar pero insuficiente o inadecuado perfil fenólico, y se hace necesario aportar a la masa de vendimia los fenoles necesarios para obtener una correcta estabilidad del color en los vinos. En este sentido, se han diseñado estrategias de aprovechamiento de subproductos de la industria vitivinícola ricos en compuestos fenólicos. Es el caso de la adición de semillas procedentes de uvas muy maduras.

En este trabajo se ha estudiado la evolución y la estabilidad del color de tres vinos de la variedad de uva tinta Syrah, elaborados mediante vinificación en tinto, incluyendo en el proceso la adición de semillas de uvas sobremaduras, sometidas a procesos de pasificación, procedentes de la elaboración de vinos blancos generosos de alto contenido alcohólico. Los vinos se elaboraron con adición de diferentes cantidades de semillas: nada (T, testigo, 0 g/L), simple (S, 3 g/L) y doble (D, 6 g/L). Se ha realizado el seguimiento de los ensayos a lo largo de la vinificación, evaluando los efectos de esta práctica en la composición química y en el color. Se han determinado parámetros químicos (antocianos, flavanoles, fenoles totales y copigmentación) mediante técnicas cromatográficas y el color por espectrocolorimetría de transmisión.

Los resultados muestran que, aunque no se da una diferenciación completa de los vinos, la introducción de semillas maduras en la elaboración produce efectos que llevan a diferencias significativas entre los ensayos, especialmente en el caso del ensayo de adición simple de semillas con respecto al de adición doble y al testigo.

Palabras Clave: vino tinto, color, semillas, antocianos, compuestos fenólicos.

ABSTRACT

Changes occurring along the maturation of grapes in warm climates, as the case of Andalucía, provoke a noticeable separation between both phenolic and technological (sugars) maturity. This gap leads to obtain grapes having high sugar content but low or inadequate phenolic composition. Therefore, it is necessary to increase the phenolic content to achieve the colour stability. In this sense, industries have designed strategies for using the winemaking by-products as sources of phenolics. This is the case of high-maturation grape seeds.

This work involves the study of the evolution and the colour stability of three red wines obtained from Syrah red grapes. The wines were elaborated by traditional winemaking including the addition of over-ripped grape seeds (originated in the production of fortified or “*generoso*” wines) at different levels: test or control assay [T] (0 g/L), simple assay [S] (3 g/L), and double assay [D] (6 g/L). The wines were chemically (anthocyanins, flavanols, total phenols and copigmentation) and chromatically analysed by HPLC and spectrophotometric techniques along the complete winemaking process to assess the effects of this oenological practice.

The results showed that, although there is not a complete differentiation of wines, the use of over-ripped seeds produces effects that induce significant differences on some parameters, especially regarding the simple assay [S].

Keywords: *red wine, colour, seeds, anthocyanins, phenolic compounds.*

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. La vid.

La vid (*Vitis vinífera* L.) es un arbusto de la familia de las Vitáceas. Su fruto, la uva, tiene forma de baya redonda, pequeña y carnosa, que crece en forma de racimos en distinta cantidad.

Tiene su origen en el Cáucaso y Asia Occidental, y se conocen vestigios de su recolección desde el Paleolítico. La egipcia, griega y romana fueron civilizaciones que desarrollaron el arte de la viticultura. Fue introducida en el continente americano por los españoles (Hernán Cortés en México y luego en el Perú). Más tarde, con la colonización, la vid fue introducida en América de Norte extendiéndose su cultivo rápidamente. A finales del s. XIX, el cultivo de la vid en Europa se redujo drásticamente por el ataque de un insecto llamado Filoxera, hasta el punto de que, en los años 30, el cultivo de la vid estuvo a punto de desaparecer por la proliferación de este insecto, viéndose obligados a utilizar la vid americana resistente a la Filoxera como patrón de la vid europea. (Vogt, 1986).

Se pueden considerar dos grandes grupos de variedades de uva:

- Uva de mesa: variedades que pueden consumirse en fresco o como pasa, más grandes, dulces y jugosas, con proliferación de variedades apirenas (sin semillas) tanto blancas como tintas.
- Uva de vinificación: variedades menos dulces y más ácidas que las de mesa por lo general. Entre ellas, la uva de hollejo rojizo se utilizará para la elaboración de vinos tintos y rosados, ya que los pigmentos responsables de su color se extraen de las partes sólidas en maceración durante la fermentación.

En el estudio desarrollado en esta Memoria se ha utilizado la variedad tinta *Syrah*, originaria del Ródano, por selección de vides silvestres. Hoy en día, esta

variedad se cultiva en todas las zonas relativamente cálidas del mundo, por su buena adaptación, destacando Italia, Estados Unidos, Sudáfrica, Argentina, Nueva Zelanda y España.



Figura 1: Racimo de Syrah.

Sus racimos poseen bayas uniformes, con piel media-gruesa, pámpanos medios, largos y frágiles. Las cepas son sensibles al viento, muy sensibles a la clorosis (enfermedad de la vid por carencia de hierro) y mal adaptada a suelos calizos. A partir de esta variedad se obtienen vinos tintos de buen grado alcohólico, aptos para un envejecimiento de gran calidad, de color intenso, con tonos azulados, muy aromáticos, con aromas finos y complejos que recuerdan la violeta, el cuero, el tabaco y el regaliz, tánicos, con estructura y relativamente poco ácidos. (*Hidalgo, 2011*).

1.2. El color del vino.

Muchos de los compuestos fenólicos de la uva y el vino poseen una estructura molecular común, que presenta al menos un anillo aromático con uno o más hidroxilos como sustituyentes. Se clasifican en diferentes familias (Tabla 2):

Tabla 1: Clasificación química de los fenoles en el vino.

No Flavonoideos	Ácidos Fenólicos	Benzoicos	Hidroxibenzóico
			Gálico
			Procatequico
			Siríngico
			Vinílico
			Gentísico
			Elágico
		Cinámicos	p-Cumárico
			Cafeico
			Ferúlico
Flavonoideos	Estilbenos	Resveratrol	
	Flavanoles	Catequinas	(+)-Catequina
			(-)-Catequina
			(+)-Epicatequina
			(-)-Epicatequina
		Proantocianidinas	
	Flavonoles	Kaemferol	
		Quercetina	
		Miricetina	
	Antocianos	Antocianinas	Cianidina 3-gl
			Delfinidina 3-gl
			Petunidina 3-gl
			Peonidina 3-gl
			Malvidina 3-gl
		Derivados acetilados	
		Derivado p-cumarílicos	

- No flavonoideos: esta denominación comprende los ácidos fenólicos, divididos en ácidos benzoicos y ácidos cinámicos, portadores de una cadena lateral insaturada, y también incluye a otros derivados fenólicos como los estilbenos.

- ✓ Derivados del ácido benzoico (C_6-C_1): gálico, vanílico, protocatéquico, elágico, sirínico. Frecuentes en uva tinta y menos en uva blanca. En vinos, su presencia es de 0,1 a 30 mg/L, sobre todo los ácidos sirínico y vanílico en vinos tintos.
- ✓ Derivados del ácido cinámico: p-cumárico, cafeico y ferúlico. Son abundantes en uva tinta y menos en uva blanca. En vinos tintos con crianza en barrica asciende hasta 100 mg/L, debido a la cesión de estos compuestos por parte de la madera.
- ✓ Estilbenos: Entre ellos, destaca la presencia en uva de resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) en forma *trans* y su derivado glucosilado.
- Flavonoides: se caracterizan por un esqueleto de base de 15 átomos de carbono ($C_6 - C_3 - C_6$) de tipo 2-fenilbenzopirona. Esta gran familia se divide en varias subclases, que se distinguen por el grado de oxidación de su núcleo pirano.
 - ✓ Flavanoles: su estructura está formada por dos anillos bencénicos unidos por un heterociclo oxigenado saturado. Pueden encontrarse cuatro isómeros: (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-catequina y (+)-epicatequina. Las formas dímeras, oligoméricas y poliméricas son capaces de liberar antocianos por calentamiento en medio ácido. En los vinos jóvenes se encuentran con mucha frecuencia. Los taninos por su capacidad de precipitación de proteínas, son responsables de la astringencia en vino.
 - ✓ Flavonoles: kenferol, quercetina y miricetina. Constituye el pigmento amarillo en el vino tinto enmascarado por el rojo violáceo de los antocianos.
 - ✓ Antocianos: delfinina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina. Químicamente son sales derivadas del ión 2-fenilbenzopirilo o flavilio. Poseen quince átomos de carbono dispuestos en dos anillos bencénicos y un heterociclo central, oxigenado y piránico. (Figura 2).

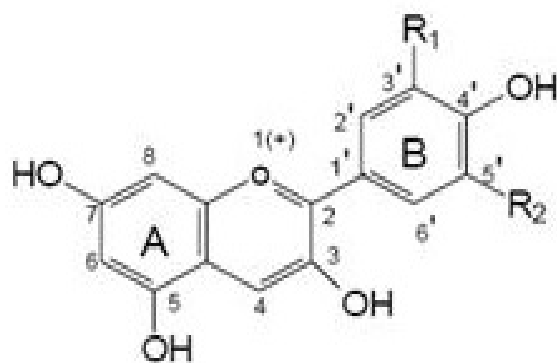


Figura 2: Esquema general de una antocianidina.

Las antocianinas de las uvas tintas derivan de cinco aglucones cuyas estructuras se diferencian entre si según el número de sustituyentes de grupos hidroxilos y metilos presentes en el anillo B (Figura 3).

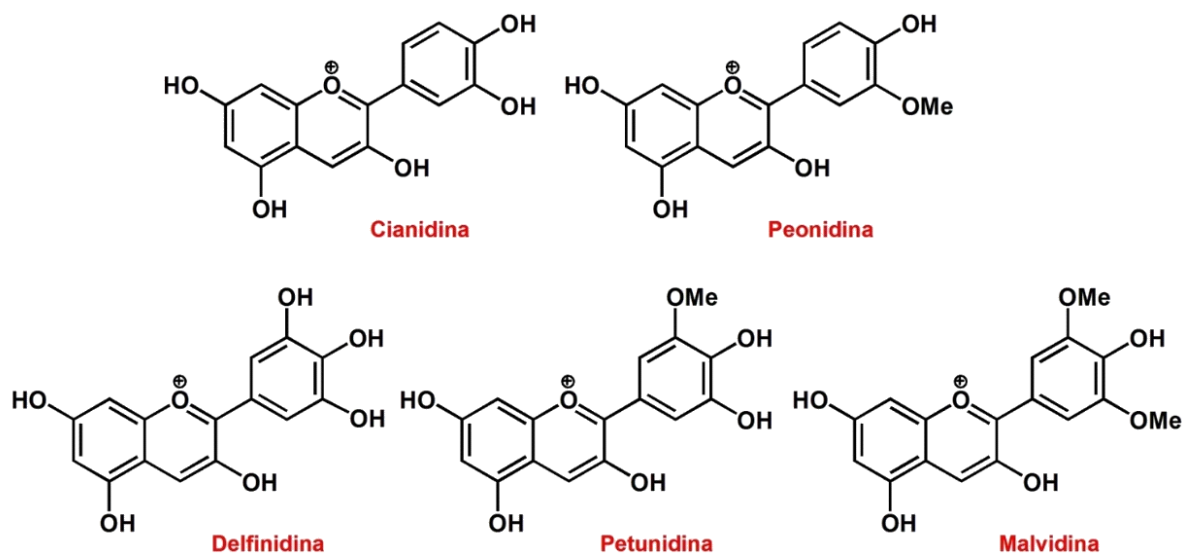


Figura 3: Antocianidinas de la uva.

En las uvas (*Vitis vinifera*), las antocianidinas se encuentran unidas a uno o más azúcares en posición 3, generalmente formando monoglucósidos no acilados. También pueden encontrarse unidas a través del ácido acético, y en menor medida formando derivados acilados. (Figuras 4 y 5) (Gil, 2010)

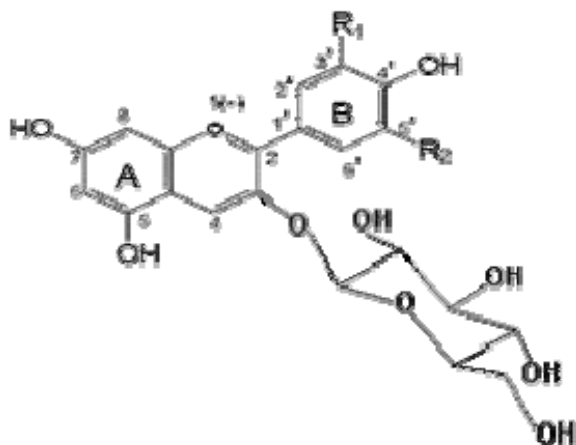


Figura 4: Estructura general de una antocianina

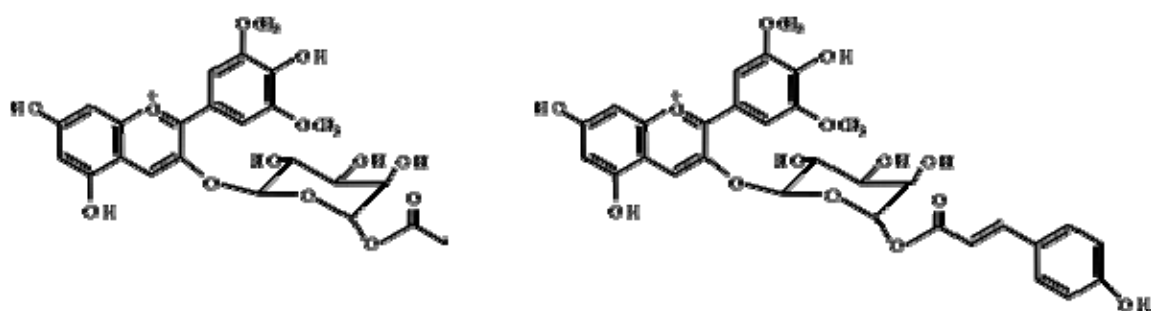


Figura 5: Estructuras de los antocianos acilados (con ácido acético o p-cumárico) en el azúcar.

1.3. Transferencia de color al vino.

Los antocianos y demás compuestos fenólicos se extraen y difunden desde las partes sólidas de la uva hacia el mosto tras el estrujado. La primera extracción se produce durante la maceración prefermentativa (desde el estrujado de la uva hasta el principio de la fermentación alcohólica) en ausencia de etanol, y durante la fermentación alcohólica se produce extracción en presencia de etanol (maceración fermentativa).

Los antocianos, más solubles en medio acuoso, se extraen desde la fase prefermentativa. La máxima extracción ocurre en pocos días y después se observa una tendencia a disminuir debido a fenómenos de oxidación, precipitación y adsorción (*King et al.*, 1980; *Brouillar*, 1982; *Santos-Buelga*, 2001; *Cuiner*, 1997).

La solubilización de los taninos es más lenta en medio alcohólico. Se limita la extracción durante la maceración prefermentativa sin etanol en el medio con temperaturas moderadas. Durante la fermentación, aumenta la temperatura y el contenido en etanol, dando un aumento del poder extractante del líquido con mayor degradación celular, y se liberan taninos más polimerizados, los unidos a proteínas de membranas vacuolares y a los polisacáridos de la pared celular (*González-San José*, 2005). Los taninos de la piel se distinguen de los taninos de semilla en que se comienza su solubilización conjuntamente con antocianos y durante más tiempo. Los taninos de semilla no se solubilizarán hasta que haya transcurrido la mitad de la fermentación, porque el etanol disuelve la cutícula de la uva (*Ribéreau-Gayón et al.* 1999).

Durante la maceración, el vino tiene un contenido de antocianos variables, siendo la mayoría antocianos monoglucósidos libres. En el prensado se extraen más compuestos fenólicos y aumenta el contenido en antocianos libres y complejos. Ese contenido en antocianos es afectado por ciertos factores relacionados con la uva en si misma o por las condiciones de vinificación.

En relación con el estado de la uva, dado que la extracción y difusión de compuestos fenólicos se produce por la degradación de la pared celular y la ruptura de la cutícula, la maduración de la uva influirá en este proceso. En este sentido, la uva madura tiene una alta concentración de antocianos, además, fácilmente extraíbles debido a que la cubierta es más fina que en la uva verde.

Las concentraciones de antocianos y taninos de la piel aumentan durante la maduración hasta alcanzar máximos que, en el caso de los antocianos se mantienen, mientras que los taninos comienzan a descender. Los taninos de las

semillas siguen una tendencia inversa, descendiendo ligeramente a lo largo de esta etapa (Figura 6).

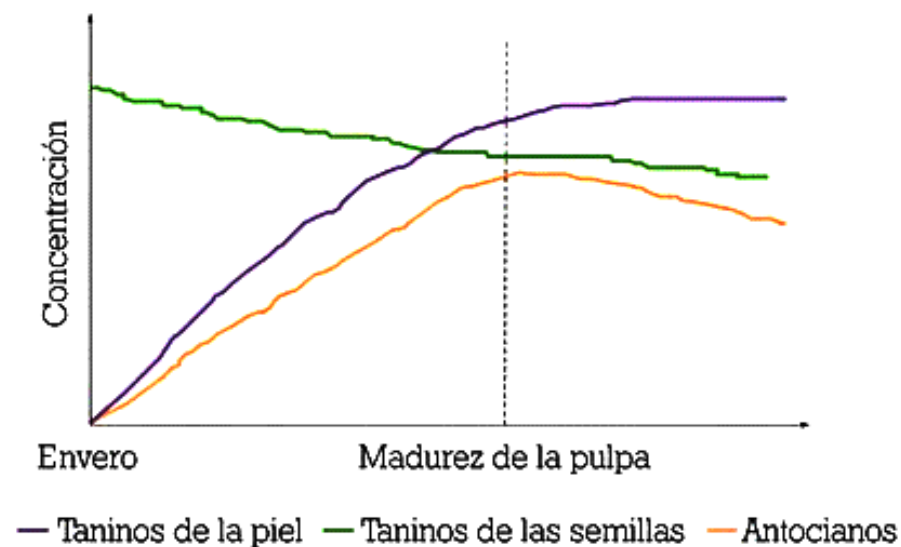


Figura 6: Evolución de los compuestos fenólicos (Kountoudakis et al., 2009)

Al inicio del encubado, existe un medio acuoso a una temperatura algo baja. Estas condiciones no facilitan la solubilización de los antocianos del hollejo, que sí se producirá más fácilmente durante la fermentación por la producción de alcohol y el aumento de la temperatura.

También, las condiciones de vinificación son cruciales a la hora de la extracción de color. Si se desean vinos jóvenes, la maceración ha de ser corta para que el vino no sea muy tánico con un color intenso; si por el contrario el objetivo son vinos para una evolución prolongada en bodega y en botella, se debe aumentar el tiempo de maceración para alcanzar mayor concentración en antocianos y un incremento de fenoles totales (Riberéau-Gayon, 1982) (Figura 7).

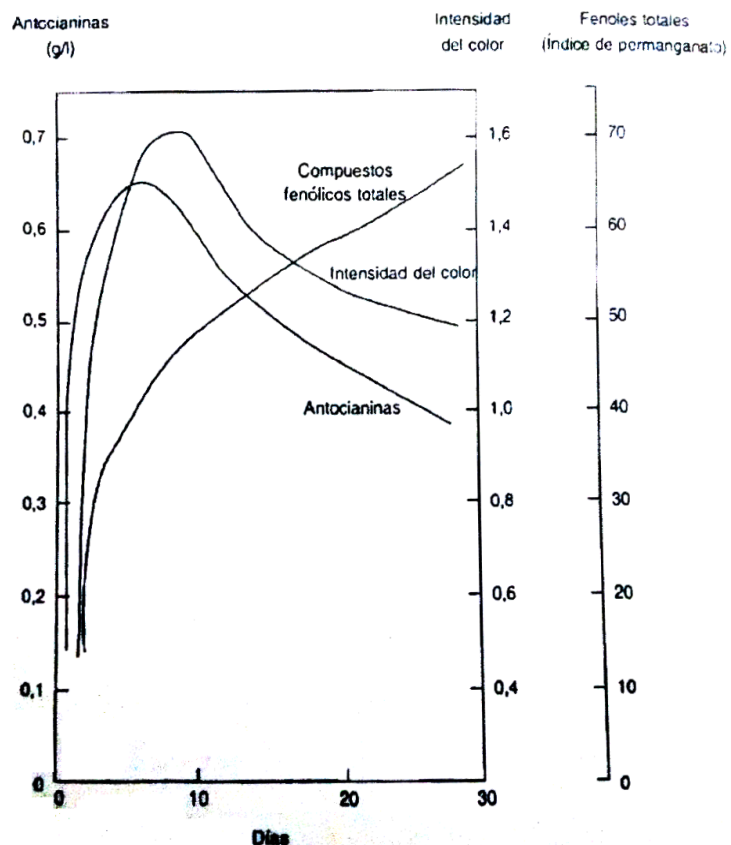


Figura 7: Evolución de la intensidad del color, antocianos y fenoles totales.

1.4. Equilibrio de los antocianos del vino.

El vino es una disolución hidroalcohólica donde se encuentran los antocianos en equilibrio químico de las distintas formas en función del pH y la presencia de iones bisulfito (Figura 8). Según esté desplazado este equilibrio hacia unas formas u otras, aparecerán distintas propiedades cromáticas (*Heredia et al.*, 1998).

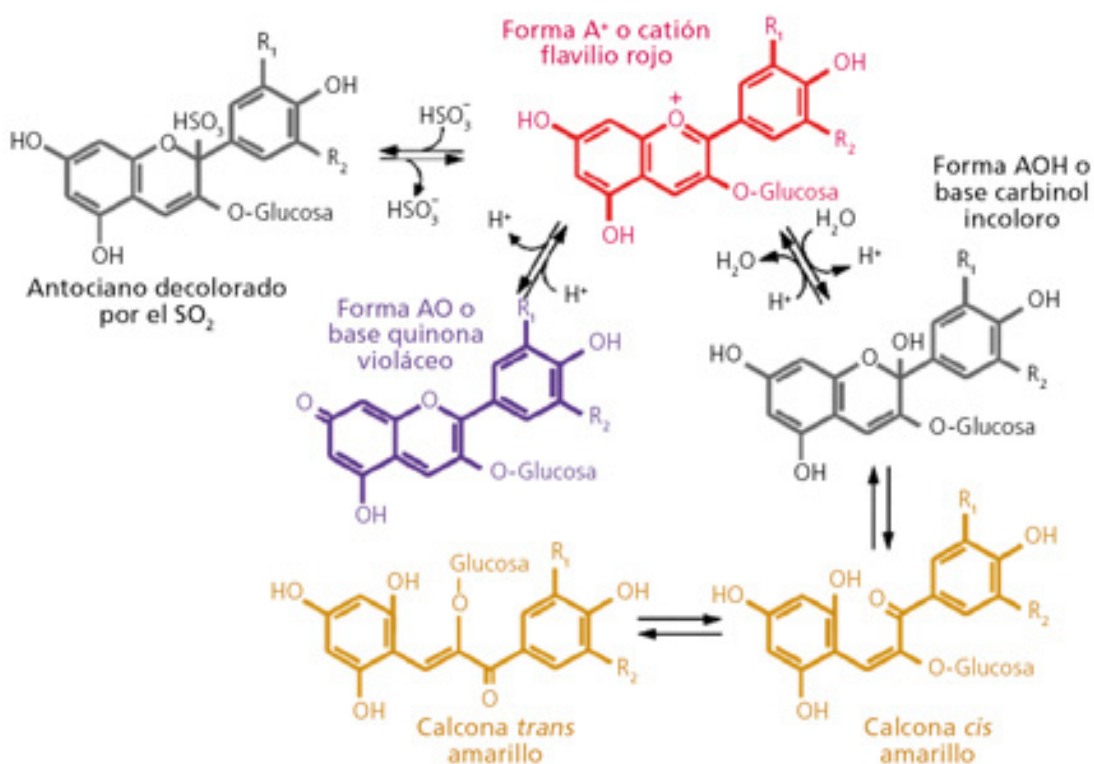


Figura 8: Estructuras del equilibrio antociánico en función del pH y del ion bisulfito

Todas estas reacciones del equilibrio son reversibles. A pH muy ácidos tenemos colores rojos debido al predominio del catión flavilio. El pH del vino se encuentra entre 3,4 y 4. La mayoría de los antocianos se encuentran en formas incoloras o débilmente coloreadas. El aumento del pH hace que los antocianos se transformen en bases quinónicas de color azulado, variando el color desde malva a azul, y en amarillo con pH superiores a 7.

El ion bisulfito en el vino se encuentra en su forma de anhídrido sulfuroso libre (anión sulfuroso) que reacciona con los antocianos formando compuestos incoloros, por ello cuando se añade sulfuroso a los vinos tintos, éstos pierden parte de su color reversiblemente.

La copigmentación es un equilibrio que implica la asociación preferencial y no covalente de las formas coloreadas de los antocianos con grupos normalmente

incolores, que se denominan copigmentos, formando apilamientos moleculares (Figura 9).

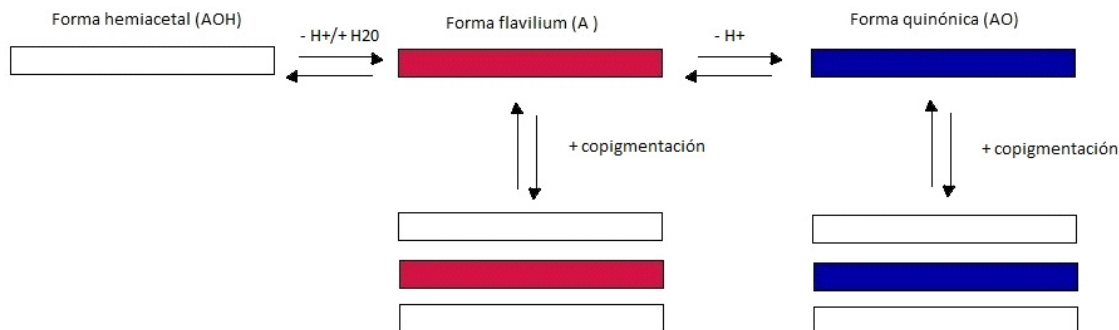


Figura 9: Proceso de copigmentación.

Las reacciones de copigmentación pueden ocurrir entre moléculas de antocianos (*autoasociación*) o entre antocianos y otros compuestos (*copigmentación intermolecular*). Como copigmentos pueden actuar sustancias muy distintas: polisacáridos, polifenoles, alcaloides, aminoácidos, ácidos orgánicos, nucleótidos, ácidos orgánicos y flavonoides, que deben adoptar configuración plana para su asociación.

La intensidad de color y su variedad de matices en los antocianos a valores de pH donde son incolores se explica por el desplazamiento en la longitud de onda de máxima absorción hacia valores mayores (efecto batocrómico) y el aumento de los valores de absorción (efecto hiperocrómico) que ocurre como consecuencia del fenómeno de copigmentación (Berké., 2007; Goto et al., 1986; Gómez-Miguez, 2006; Hoshino et al., 1981,1991).

La eficacia y la intensidad de la copigmentación dependen de distintos factores: concentraciones de los pigmentos y copigmentos, su estructura química, relación molar pigmento/copigmento, pH del medio, temperatura...

Con el tiempo, las asociaciones pigmentos-copigmentos dan lugar a otros nuevos pigmentos más estables mediante enlaces covalentes. Estos pigmentos más complejos se denominan pigmentos antociánicos derivados, que son moléculas de mayor o menor grado de polimerización.

1.5. El color y su medida.

1.5.1. El color.

El color es una respuesta mental al estímulo que una radiación luminosa visible produce en la retina. Se considera un concepto psicofísico, relacionado al mismo tiempo con la psicología del observador, la fisiología de la visión y la energía radiante espectral de una fuente luminosa.

El estímulo cromático está compuesto por tres sensaciones bien diferenciadas, que dan al color su carácter tridimensional, y son:

- El **matiz** o **tono**. Tradicionalmente definido como el que nos permite clasificar los colores como rojizos, amarillentos, etc. Aquél que permite diferenciar un color respecto al gris del mismo brillo, denominado estímulo acromático. Está relacionado con las diferencias de la energía radiante a diferentes longitudes de onda (λ). Es el atributo cualitativo del color.
- La **claridad** es la característica por la que un color puede clasificarse, en términos generales, como claro u oscuro. Más exactamente, se puede definir como el atributo en virtud del cual los colores pueden considerarse equivalentes a alguno de los miembros de la escala de grises, entre el negro y el blanco. Es una medida relativa de la luz reflejada o transmitida frente a la absorbida.
- La **saturación** o **pureza**, que determina para cada matiz su grado de diferencia frente al gris del mismo brillo, y describe la reflexión o transmisión a una determinada longitud de onda.

Se considera que el matiz es la medida cualitativa de la cromaticidad y la saturación la cuantitativa.

1.5.2. Instrumentación colorimétrica.

La definición del color y su medida es un objetivo perseguido hace siglos por muchos hombres de ciencia. La determinación de color puede realizarse de dos modos diferentes:

- Evaluación visual.
- Medida instrumental, con aparatos específicos.

En el segundo caso, existen dos grandes grupos de instrumentos (Figura 10) para medir el color de un objeto: los que miden directamente los valores triestímulo (colorímetros), y los que miden la magnitud radiométrica o fotométrica que caracteriza a la fuente o al objeto, a partir de la cual se calculan los valores triestímulo (espectrofotómetro y espectrorradiómetro):

- *Colorímetros*: miden el color de fuentes de radiación, primarias (que emiten luz primaria) y secundarias (reflejan o transmiten luz externa), y se obtienen los valores X, Y, Z de forma óptica, no matemática. El colorímetro reproduce la respuesta de sólo un observador patrón y un iluminante estándar preestablecidos, por lo que los valores obtenidos son distintos para cada instrumento.
- *Espectrofotómetro*: es el instrumento fundamental en la medida del color. Tiene la capacidad de manejar una radiación electromagnética (REM), comúnmente denominada luz, separándola para facilitar la identificación, calificación y cuantificación de su energía. Miden la distribución espectral de un objeto, de transmitancia o reflectancia, a partir de la cual se puede calcular el color bajo distintas condiciones. La medida de la transmitancia es el cociente entre la respuesta del instrumento en presencia de la muestra y cuando la muestra no está en el camino óptico. La reflectancia es el cociente entre la respuesta del instrumento a la muestra y la respuesta a un patrón conocido (normalmente blanco), multiplicado por la

reflectancia intrínseca del patrón. Los equipos se componen de tres partes fundamentales: fuente de luz, monocromador y fotodetector.

- *Espectrorradiómetros*: obtienen la medida radiométrica de la distribución espectral de una fuente de radiación (primaria o secundaria). Con un fundamento igual que el anterior, calculan matemáticamente, los valores triestímulo. Tiene los mismos componentes que el espectrofotómetro con la excepción de que la fuente de luz es externa al instrumento, por lo tanto, variable. La medida puede ser de transmitancia o reflectancia modificando la posición relativa de la fuente de iluminación.



Figura 10: a) Colorímetro; b) Espectrofotómetro; c) Espectrorradiómetro.

Técnicas digitales

En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas, como el Análisis Digital de Imagen que, además de medir el color, permiten determinar otras propiedades de la apariencia de los objetos (rugosidad, brillo, tamaño, forma, etc.). Estas técnicas tienen especial interés en estudios de correlación con la apreciación visual o la discriminación de objetos.

2. OBJETIVOS

Este trabajo está desarrollado dentro de una línea de investigación basada en el estudio del aprovechamiento de subproductos de la vinificación para estabilizar el color del vino tinto en climas cálidos.

El objetivo general de este trabajo es evaluar el uso de semillas de uva, procedentes de la vinificación de generosos, como fuente de fenoles en la elaboración de vinos tintos de variedad Syrah.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Realizar un seguimiento de la evolución cromática de vinos tintos de variedad Syrah mediante las coordenadas colorimétricas del espacio de color CIELAB.
- Estudiar la evolución de la química de los pigmentos antociánicos responsables del color en los vinos elaborados, así como de otros fenoles relacionados con la estabilidad del color.
- Evaluar el efecto producido por la adición de diferentes cantidades de semillas de uvas muy maduras.
- Estudiar el efecto sobre el color de los pigmentos derivados de antocianos.
- Evaluar el efecto que tiene sobre el color la copigmentación producida por los fenoles extraídos de las semillas de uva.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Descripción de los ensayos.

Para desarrollar este estudio se han utilizado uvas de la variedad Syrah, cultivadas en parcelas ubicadas en Rociana del Condado (Huelva).



Figura 11: Cepa de Syrah durante el muestreo.

Se realizó el seguimiento de la maduración y, cuando se consideró que la uva había alcanzado el grado adecuado, se procedió a su vendimia y se transportó hasta la Cooperativa “Nuestra Señora de Socorro” (Rociana del Condado, Huelva) para su procesado en la bodega experimental. Tras el estrujado, la masa de vendimia se encubó en depósitos de polietileno de 220 L de capacidad (Figura 12), dejando un espacio suficiente para el aumento del volumen que se produce durante la fermentación, por lo que cada depósito se llenó, aproximadamente, con 150 kg de uva estrujada.



Figura 12: Depósitos de fermentación (220 L) y vinificación (50 L).

Se plantearon tres ensayos para estudiar el efecto de la adición de una fuente natural de copigmentos en el vino. En este caso, se utilizaron semillas de uvas sobremaduras de la variedad blanca Pedro Ximenez (PX), procedentes de la elaboración de vinos generosos. Estas uvas son pasificadas, sometidas a concentración de los azúcares por exposición al sol en paseras.

El proceso de pasificación se realiza tras la recolección de la cosecha, los racimos de uva se colocan sobre redores o capachos de esparto y se exponen al sol durante cinco a siete días. La uva pierde agua lentamente y se concentran sus compuestos (Figura 13).



Figura 13: Proceso de pasificación

Los ensayos llevados a cabo fueron:

- Testigo (T): vino elaborado por vinificación en tinto tradicional
- Simple (S): id. con adición de una cantidad fija de semillas (450 g/depósito)
- Doble (D): id. con doble adición de semillas del ensayo S (900 g/depósito)

Con intención de obtener una cantidad de vino suficiente para realizar un triplicado de los ensayos, se prepararon dos depósitos de vinificación para cada ensayo, por lo que se obtuvieron 6 depósitos en total: 2 depósitos del ensayo testigo (sin adición de semillas), 2 depósitos del ensayo simple (con 450 g de semillas) y 2 depósitos del ensayo doble (con 900 g de semillas).

Durante seis días de fermentación, se realizaron operaciones de bazuqueo y remontado de los depósitos, tomando muestras para su seguimiento. Al séptimo día, se llevó a cabo el descube de los vinos, es decir, se eliminaron las partes sólidas (hollejos y semillas), para dejar que el líquido continúe el proceso de vinificación. El contenido líquido unificado de cada par de depósitos de un mismo ensayo se repartió en 3 depósitos de acero inoxidable de 50 L, constituyendo así un triplicado de cada ensayo (Figura 14).

Se continuó tomando muestras diarias de los nuevos depósitos y a su vez se realizaron las tareas propias de la vinificación en tinto (sulfitados, control de la fermentación maloláctica...) hasta el final de la vinificación.

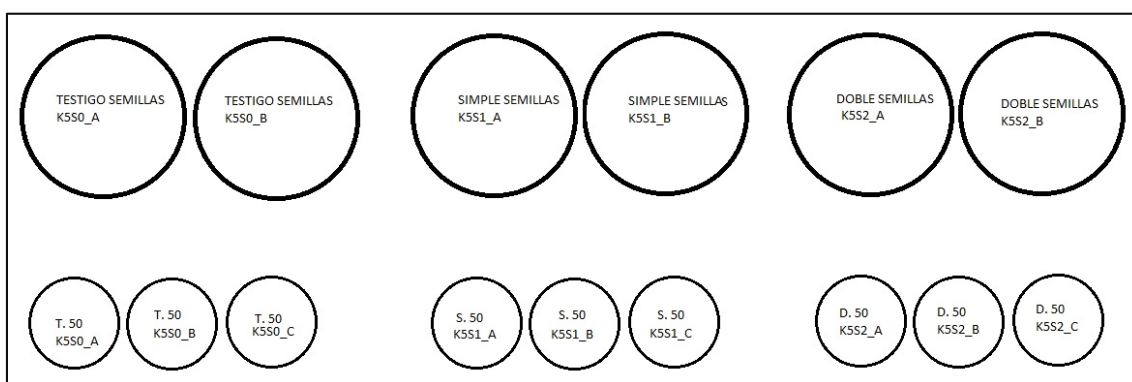


Figura 14: Esquema de la distribución de los depósitos de fermentación y de vinificación tras los trasiegos.

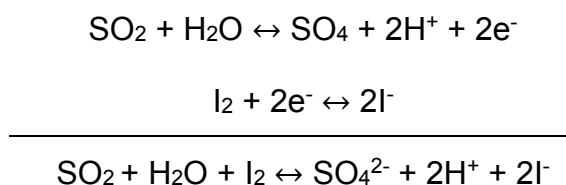
Una vez completada la fase de vinificación en depósito, se dividió el contenido en dos lotes para el seguimiento del vino: una parte se embotelló para estudiar su evolución en botella y otra parte se destinó a crianza en depósito de acero con chips de roble americano de tostado medio, a una proporción aproximada de 3 g/L.

3.2. Determinaciones enológicas

Para el seguimiento y control de los vinos, se llevaron a cabo los análisis físico-químicos habituales de interés enológico.

3.2.1. Anhídrido sulfuroso total. (CEE, 1990; OIV, 1990)

La determinación de anhídrido sulfuroso se realizó por volumetría de óxido-reducción, con I₂ como reactivo en medio ácido y en presencia de almidón como indicador, produciéndose las siguientes reacciones:



Para la determinación del anhídrido sulfuroso total es necesario hidrolizarlo de sus uniones mediante la adición de una base fuerte y después acidular y valorar directamente con yodo (Amerine y Ough, 1976).

- Procedimiento: se introducen 20 mL de vino y 10 mL de hidróxido de potasio 1 M en un matraz Erlenmeyer; se agita y se deja en reposo durante 15 minutos. Luego, se añaden 5 mL de una disolución de ácido sulfúrico 1:3 y 1 mL de disolución de almidón al 2%, y se valora rápidamente con una disolución de yodo 0,02 N hasta la aparición de coloración azul persistente (>15 s).

- Cálculo: expresado en mg/L según la siguiente expresión:

$$\text{SO}_2 \text{ TOTAL} = [V \times N \times P_m \times 1000] / V' = V \times 32 \text{ mg/L}$$

V = Volumen (mL) de yodo 0.02 N que se consumió en la valoración.

N = Normalidad del yodo que se usó en la valoración (0.02 N).

P_m = Peso molecular del anhídrido sulfuroso (P_m = 32).

V' = Volumen (mL) de muestra analizada (20 mL).

3.2.2. pH (CEE, 1990; OIV, 1990)

La determinación del pH en el vino es una medida complementaria de la acidez total. Su fundamento se basa en la medida de la diferencia de potencial entre dos electrodos sumergidos en la muestra de vino. Uno de estos electrodos tiene un potencial definido en función de la actividad del ion hidrógeno de la muestra; el otro electrodo tiene un potencial fijo y conocido.

- Procedimiento: se utiliza un pH-metro, calibrado con disoluciones tampón de pH=4 y pH=7, sumergiendo el electrodo en el vino, a una temperatura de 20 °C, durante 15 segundos.
- Cálculo: Lectura directa.

3.2.3. Acidez Total (CEE, 1990; OIV, 1990).

La acidez total del vino se determinó mediante volumetría ácido-base con detección potenciométrica. Según las recomendaciones de la OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino), la acidez total se define como la suma de los ácidos valorables hasta pH=7, por adición de hidróxido sódico y se expresa el resultado en g/L de ácido tartárico, al ser éste el mayoritario en vinos.

- Procedimiento: en un matraz Erlenmeyer se colocan 10 mL de vino y se valoran con NaOH 0.1 N hasta pH 7.0, anotando el volumen gastado.
- Cálculo: se expresa en g/L de ácido tartárico, según la siguiente ecuación:

$$\text{Acidez Total} = (V \times N \times P_m) / (2 \times V') \text{ g/L ácido tartárico}$$

V = Volumen (mL.) de NaOH consumidos en la valoración.

N = Normalidad del hidróxido sódico.

Pm = Peso molecular del ácido tartárico (150.09).

V' = Volumen (mL) de muestra analizada (10 mL)

3.2.4. Acidez Volátil (*Método García Tena, García, J. 2005*)

Es el conjunto de ácidos grasos de la serie acética que se hallan en el vino, libres o combinados formando sales. El más importante es el ácido acético. Se utilizó el método García Tena (*García Tena, 1969*), basado en una destilación fraccionada del vino, una vez eliminado el dióxido de carbono y una posterior valoración ácido-base de la segunda fracción del destilado.

- Procedimiento: se destilan 11 mL de vino, se desechan los primeros 5.1 mL del destilado y se recogen los siguientes 3.2 mL, que se valoran con NaOH 0.02 M hasta obtener el viraje de color a rosado de la fenolftaleína.
- Cálculos: Acidez Volátil (expresada en g/L ác. acético) = $0.366 \times V$
V = mL de hidróxido sódico 0.02 M consumidos en la valoración.
0.366 = factor del cálculo estequiométrico del hidróxido sódico

3.3. Determinación del color por espectrofotometría

Las muestras recogidas durante todas las etapas de la elaboración del vino se sometieron a un seguimiento de analítico en relación con el color. Las técnicas y procedimientos correspondientes se recogen en este apartado.

Para el análisis del color del vino, las muestras de vino se pasaron a través de filtros Millipore AP20, de 45 μ de tamaño de poro, y se realizó la medida en cubeta de vidrio de 2 mm de paso de luz, por espectrofotometría de transmisión, en un espectrofotómetro de diodos UV-Visible Agilent 8453 (Agilent Technologies Inc.) (Figura 15).



Figura 15: Media por transmisión y preparación de la muestra

De este modo se registraron los espectros de transmitancia de las muestras en el intervalo visible (380-780 nm), y se integraron utilizando el programa de cálculo CromaLab® (Heredia, Álvarez, González-Miret & Ramírez, 2004), que tiene en cuenta las recomendaciones de la *Commission Internationale de l'Éclairage* (CIE, 2004). Las coordenadas de color del espacio uniforme CIE 1976-(L* a* b*) (CIELAB) se obtienen considerando como referencia el observador estándar de 10° y el iluminante estándar D65.

3.4. Determinación espectrofotométrica del porcentaje de antocianos copigmentados y pigmentos poliméricos (Boulton, 1996).

El método Boulton (1996) propone medidas espectrofotométricas para determinar los antocianos copigmentados, los antocianos libres y los pigmentos poliméricos de un vino tinto. Para ello, es necesario ajustar inicialmente las muestras de vino a un pH de 3.6.

El *color total* del vino (A^{acet}) se calcula como la absorbancia a 520 nm después de eliminar el efecto del sulfuroso mediante la adición de 20 μL de acetaldehído

al 10% a la muestra de vino, esperando 45 minutos para que se complete la reacción antes de realizar la medida.

El color debido a los *pigmentos poliméricos* (A^{SO_2}) es la absorbancia a 520 nm después de la adición de una disolución de SO_2 a la muestra de vino.

Una parte de los antocianos del vino se encuentran copigmentados. El color del vino sin la contribución de los *antocianos copigmentados* (A^{20}) es la absorbancia a 520 nm de la muestra de vino diluida 20 veces con una disolución tampón (200 μ l de vino diluido con 3800 μ l de vino sintético). La hidratación producida por esta dilución conduce a la disociación de los complejos de copigmentación existentes, mientras permanece la contribución de los antocianos libres y de los pigmentos poliméricos.

Con estas medidas se obtiene:

- **Porcentaje de color debido a antocianos copigmentados:**

$$[(A^{acet} - A^{20}) / A^{acet}] \times 100$$

- **Porcentaje de color debido a pigmentos poliméricos:**

$$(A^{SO_2} / A^{acet}) \times 100.$$

3.5. Determinación del contenido de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu.

Los compuestos fenólicos del vino se oxidan por el reactivo Folin-Ciocalteu, formado por una mezcla de ácidos fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$). El reactivo se reduce y da una mezcla de óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}) de color azul, que presenta un espectro de absorción con λ_{max} a 765 nm, que es proporcional al contenido total de compuestos fenólicos.

- Procedimiento: A partir de una disolución madre de 5 g/L se preparan disoluciones de 0 (blanco de reactivo), 50, 100, 150, 250 y 500 mg/L de ácido gálico.

0,25 mL de cada disolución se hace reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu y una disolución de carbonato sódico al 20% y se determina la absorbancia de cada disolución frente al blanco (agua destilada), a 765 nm y en cubetas de vidrio de 10 mm, tras 2 horas de reposo. Así se obtiene la recta de calibrado.

El análisis de la muestra de vino (25 μ L) se realiza de manera análoga a los patrones.

- Cálculos: A partir de la recta de calibrado obtenida con las disoluciones del patrón de ácido gálico se calcula el contenido total de fenoles presentes en la muestra.

3.6. Determinación de flavanoles en muestra de vino mediante el método del p-dimetilaminocinamaldehído (DMACA).

El método se basa en la medida espectrofotométrica de la absorbancia a 640 nm, para determinar la cantidad de flavanoles del vino, utilizando una recta de calibrado realizada con disoluciones patrón de catequina.

- Procedimiento: Patrón de catequina. A partir de una disolución madre de 250 mg/L. se preparan disoluciones de 0 (blanco de reactivo), 4, 8, 12, 16, 20 y 24 mg/L de catequina.

200 μ L de cada disolución se hacen reaccionar con el reactivo DMACA y HCl/MeOH al 10% y, tras 10 minutos de reposo, se mide la absorbancia a 640 nm de cada una de las disoluciones, en una cubeta de vidrio de 10 mm, tomando como referencia HCl/MeOH al 10%, y se obtiene la recta de calibrado.

El análisis de las muestras de vino (10 µL) se realiza de manera análoga a los patrones.

- Cálculos: A partir de la recta de calibrado obtenida con las disoluciones del patrón de catequina se calcula el contenido total de flavanoles presentes en la muestra.

3.7. Determinación de antocianos en vino por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Para la separación, identificación y cuantificación de las antocianinas se utilizó un cromatógrafo líquido Agilent Technologies 1110 Series, equipado con bomba cuaternaria, desgasificador de vacío, compartimento termostatzado para la columna, inyector automático, detector de diodos y software ChemStation. Como fase estacionaria se utilizó una columna de fase reversa Zorbax SB-C18, de 250 x 4.6 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula. Las fases móviles, los gradientes y las condiciones experimentales se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2: Condiciones de la fase móvil para la determinación de antocianos por HPLC.

Condiciones			
Fase móvil A:	Agua-acetonitrilo-ácido fórmico (87:3:10)		
Fase móvil B:	Agua-acetonitrilo-ácido fórmico (40:50:10)		
Temperatura	38 °C		
Flujo	0.8 mL/min		
Gradiente	Fase A	Fase B	
0-10 min	94%	6%	
10-15 min	70%	30%	
15-25 min	60%	40%	
25-35 min	55%	45%	
35-40 min	50%	50%	
40-42 min	40%	60%	
42-43 min	94%	6%	

- Procedimiento: A partir de una disolución madre de Malvidin-3-monoglucósido (30 mg/L) se preparan otras de 0.9, 1.5, 3, 6, 8.4 y 12 mg/L y se obtiene la recta de calibrado (área del pico frente a concentración). El análisis cromatográfico de las muestras se realizó por inyección directa, previa filtración de la muestra por filtros de nylon de 0.45 µm. En las muestras iniciales fue necesario una centrifugación previa.
- Cálculos: La identificación se realizó basándose en los tiempos de retención y los espectros UV-Vis, por comparación con la bibliografía existente (*Hebrero et al.*, 1988; *Revilla y Ryan*, 2000; *Vivar-Quintana et al.*, 2002). La cuantificación de los antocianos se realizó mediante la recta patrón, expresándose como malvidina-3-monoglucósido (mg/L).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Parámetros enológicos

Los parámetros enológicos (acidez total, pH, SO₂...) se analizaron con fines de control y seguimiento de la vinificación. Los resultados de estos parámetros (Tabla 3) se mantuvieron en todo momento dentro de valores que se consideran adecuados (*Riberéau-Gayón, 1999*):

Tabla 3: Parámetros enológicos.

Parámetro	Intervalo de valores medios	Intervalo de valores habituales en tintos
Acidez Total (g/L)	4,2 – 5,5	5 - 16
pH	3 – 3,98	3,3 - 3,4
SO ₂ T (mg/L)	120 - 160	≤ 140
Acidez Volátil (g/L)	0.4 - 0.7	≤ 1,2

4.2. Compuestos fenólicos.

4.2.1. Fenoles totales

La Tabla 4 recoge resultados correspondientes al contenido en **Fenoles Totales** (FT), expresados en ác. gálico (mg/L), para cada uno de los ensayos ([T]: Testigo, [S]: Simple, [D]: Doble).

Como se puede observar, la concentración de fenoles totales sigue una tendencia general ascendente en los tres ensayos. Sin embargo, los valores de desviación estándar ponen de manifiesto una elevada disparidad debido a los diferentes grados de extracción y combinación de estos compuestos a lo largo de la vinificación, incluso en los correspondientes replicados de cada tipo de vino.

Tabla 4: Contenido en Fenoles Totales (media \pm SD) para cada ensayo en las diferentes etapas de la vinificación.

Fecha	Etapas	Fenoles Totales (mg/L)		
		[T]	[S]	[D]
19/08/2015	EN	1955,55 \pm 374,61	2179,75 \pm 558,13	2376,16 \pm 608,81
20/08/2015	FA	1876,49 \pm 649,96	1889,49 \pm 120,18	2016,49 \pm 318,30
21/08/2015	FA	2156,02 \pm 461,96	1953,27 \pm 145,57	1801,51 \pm 147,41
22/08/2015	FA	2672,79 \pm 1132,54	3567,14 \pm 1461,14	2877,69 \pm 959,80
23/08/2015	FA	2320,01 \pm 811,41	2199,94 \pm 520,74	2391,02 \pm 75,40
24/08/2015	FA	2910,87 \pm 327,23	2640,66 \pm 351,90	2776,23 \pm 148,55
25/08/2015	DE	2982,89 \pm 148,46	2847,00 \pm 157,32	2850,92 \pm 63,20
01/09/2015	PRML	2828,30 \pm 77,59	2892,33 \pm 215,68	2609,95 \pm 93,86
07/09/2015	PRML	2533,31 \pm 70,46	2769,67 \pm 203,54	2582,43 \pm 108,58
14/09/2015	FML	2566,29 \pm 251,54	2716,10 \pm 188,99	2538,46 \pm 215,06
21/09/2015	FML	2569,35 \pm 141,70	2374,11 \pm 54,96	2465,02 \pm 270,10
01/10/2015	EST	2781,18 \pm 145,39	2848,88 \pm 310,67	2875,23 \pm 444,85
06/10/2015	EST	3155,91 \pm 345,78	3372,15 \pm 855,57	2795,16 \pm 36,30
13/10/2015	EST	2988,35 \pm 45,01	3073,89 \pm 23,12	2903,22 \pm 210,90
15/10/2015	EST	2927,60 \pm 207,09	3247,65 \pm 399,74	3053,62 \pm 236,96
19/10/2015	EST	3009,71 \pm 269,43	3153,41 \pm 193,25	3042,14 \pm 365,32
23/10/2015	EST	3255,02 \pm 284,06	3132,52 \pm 172,59	2999,71 \pm 108,37
29/10/2015	EST	2800,93 \pm 289,35	2989,22 \pm 438,05	2951,36 \pm 213,10
11/11/2015	EST	2893,90 \pm 84,39	2992,92 \pm 42,76	2840,36 \pm 237,16
18/11/2015	EST	2899,89 \pm 123,01	2915,19 \pm 89,85	2991,78 \pm 100,80
02/12/2015	EST	3169,92 \pm 225,34	3311,24 \pm 183,53	3001,07 \pm 247,07
15/12/2015	EST	2991,50 \pm 315,16	3098,33 \pm 160,95	2967,31 \pm 269,04
07/01/2016	EST	3217,65 \pm 376,43	3129,86 \pm 337,24	3178,93 \pm 239,58
19/01/2016	EST	2810,05 \pm 618,45	3596,21 \pm 286,88	3107,96 \pm 347,59
04/02/2016	EST	2587,68 \pm 382,19	2935,40 \pm 119,31	2902,79 \pm 86,67

EN: encubado; FA: fermentación alcohólica; DE: descube; PRML: prefermentación maloláctica; FML: fermentación maloláctica; EST: estabilización

En la Figura 16 se muestra la evolución de este parámetro a lo largo de las etapas de la vinificación. Inicialmente, se da una importante extracción desde las partes sólidas al mosto/vino durante la etapa de fermentación alcohólica, provocando un ascenso lógico hasta valores de aproximadamente 2900 mg/L.

Posteriormente, estos valores se mantienen más o menos dentro de un intervalo de tendencia estable, aunque con continuas oscilaciones.

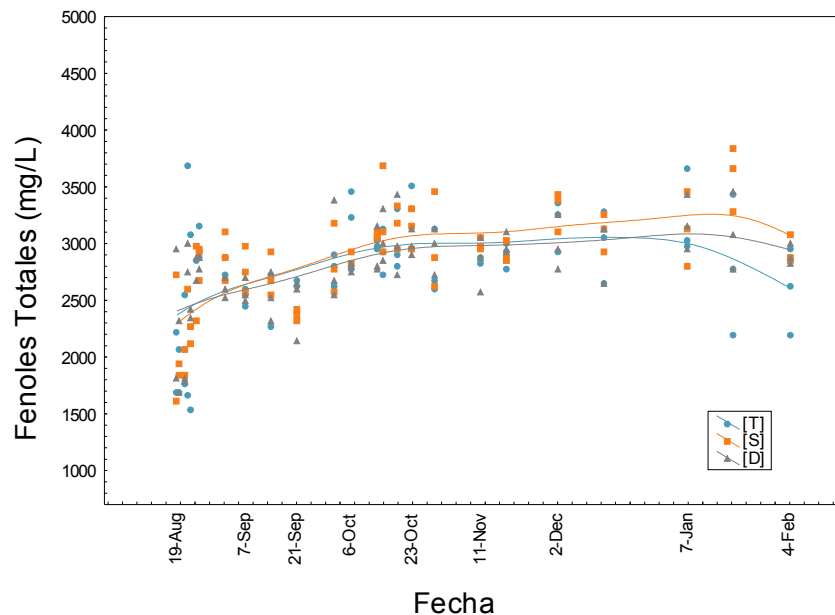


Figura 16: Evolución del contenido en Fenoles Totales

4.2.2. Identificación y cuantificación de Antocianos

La Tabla 5 muestra las concentraciones de los compuestos antociánicos totales de las muestras de vino Syrah en las diferentes etapas de la vinificación, y para cada uno de los ensayos.

Tras un fuerte ascenso inicial debido a la extracción de los antocianos de los hollejos hacia el mosto, que se incrementa con la aparición del etanol en la fermentación, se aprecia un posterior descenso durante la vinificación. Este descenso puede ser esperable en relación a la información encontrada en la bibliografía, con estudios en los que se encontraron descensos de los antocianos libres en el vino durante los primeros meses (*Vasserot et al.*, 1997).

Tabla 5: Valores de Antocianos Totales (media \pm SD) para los del vino Syrah.

Fecha	Etapa	Antocianos Totales (mg/L)		
		[T]	[S]	[D]
20/08/2015	FA	166,07 \pm 42,95	181,05 \pm 16,38	174,05 \pm 46,67
21/08/2015	FA	220,26 \pm 47,36	202,76 \pm 12,22	198,52 \pm 13,34
22/08/2015	FA	270,92 \pm 31,20	280,29 \pm 47,76	270,66 \pm 34,76
23/08/2015	FA	200,77 \pm 5,71	224,29 \pm 1,98	219,64 \pm 18,41
24/08/2015	FA	312,19 \pm 12,59	278,98 \pm 36,75	289,30 \pm 31,62
25/08/2015	DE	218,03 \pm 9,36	242,85 \pm 15,86	234,45 \pm 11,77
01/09/2015	PRML	213,56 \pm 16,09	203,29 \pm 10,26	213,41 \pm 4,40
07/09/2015	PRML	184,09 \pm 28,48	189,69 \pm 6,93	184,42 \pm 6,89
14/09/2015	FML	145,69 \pm 18,65	161,55 \pm 10,27	170,83 \pm 18,18
21/09/2015	FML	168,10 \pm 9,87	133,46 \pm 6,06	145,46 \pm 12,95
01/10/2015	EST	209,56 \pm 5,86	227,34 \pm 3,53	212,18 \pm 10,50
06/10/2015	EST	216,20 \pm 15,41	228,78 \pm 8,39	205,75 \pm 19,74
13/10/2015	EST	216,59 \pm 8,41	231,29 \pm 2,91	218,81 \pm 22,89
15/10/2015	EST	206,26 \pm 6,59	223,06 \pm 7,60	210,11 \pm 16,94
19/10/2015	EST	206,26 \pm 6,59	223,06 \pm 7,60	210,11 \pm 16,94
23/10/2015	EST	229,37 \pm 7,19	247,46 \pm 7,89	234,48 \pm 17,73
11/11/2015	EST	247,95 \pm 6,74	242,00 \pm 14,27	241,49 \pm 19,69
02/12/2015	EST	198,50 \pm 12,35	208,95 \pm 17,59	190,16 \pm 35,35
15/12/2015	EST	220,87 \pm 38,75	231,78 \pm 25,34	217,17 \pm 32,89
07/01/2016	EST	162,23 \pm 21,00	195,37 \pm 20,02	149,08 \pm 40,02
19/01/2016	EST	147,01 \pm 44,13	180,40 \pm 5,67	129,65 \pm 42,53
04/02/2016	EST	175,23 \pm 24,49	192,55 \pm 5,94	175,87 \pm 21,77

EN: encubado; FA: fermentación alcohólica; DE: descube; PRML: prefermentación maloláctica; FML: fermentación maloláctica; EST: estabilización

En la Figura 17, que representa la evolución de los antocianos totales, se puede observar un aumento debido a la extractabilidad en el proceso de fermentación. Este hecho es notable dado que la cara interna de la piel de la uva está recubierta por una capa de células que será más fina y facilitará la solubilidad de los antocianos en función de la madurez de la uva (Zamora, 2003).

En general, la concentración final de antocianos totales se muestra más alta en el ensayo de adición simple de semillas (175.8 mg/L) que en los casos sin adición (testigo) o con adición doble de semillas.

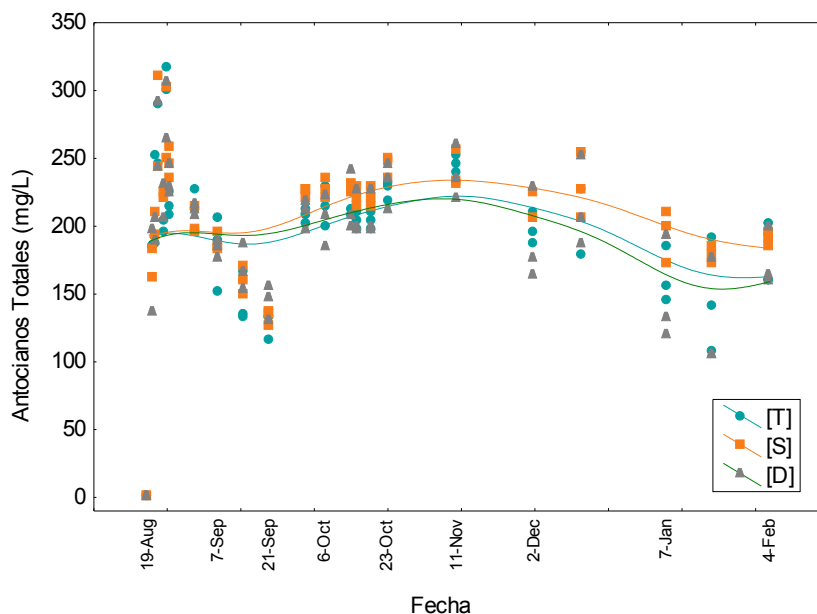


Figura 17: Evolución del contenido en Antocianos Totales.

En la Tabla 6 se recoge la concentración de los monómeros antociánicos individuales no acilados, para cada ensayo y a lo largo de la vinificación.

La fracción más abundante de los monoglucósidos no acilados es la Malvidina-3-glucósido, siendo en algunos casos valores cercanos a 137 mg/L. En el caso de Cianidina-3-glucósido, solo se encuentran cantidades detectables de este compuesto en la muestra correspondiente al primer día de fermentación ($[T]=10,1\pm1,14$, $[S]=9,7\pm1,41$, $[D]=8,2\pm2,87$), siendo no detectable a partir de entonces. Es conocido que los antocianos son degradados por reacciones de oxidación durante el proceso de vinificación, de modo que las formas dihidroxiladas de las antocianinas (delfinidina, cianidina y petunidina) son más oxidables, y por tanto su concentración disminuye más rápidamente que la de malvidina y peonidina (Yokotsuka *et al.*, 1997). También es sabido que las diferencias que se observan en la concentración y las proporciones relativas de

antocianos, y por consiguiente los perfiles antociánicos, se puede ver afectado por el origen geográfico (*Púertolas et al.*, 2011).

Tabla 6: Valores de compuestos monoglucósidos no acilados (media \pm SD) de vino Syrah.

Fecha	Etapa	Monoglucósidos no acilados (mg/L)					
		[Df-3gl]			[Pt-3gl]		
20/08/2015	FA	7,0 \pm 0,41	6,4 \pm 1,35	4,9 \pm 1,98	1,9 \pm 0,35	2,3 \pm 0,12	1,8 \pm 0,54
24/08/2015	FA	8,2 \pm 3,45	6,5 \pm 1,92	5,8 \pm 1,60	14,3 \pm 2,88	12,6 \pm 3,48	11,9 \pm 2,88
25/08/2015	DE	6,2 \pm 0,26	5,4 \pm 0,40	4,4 \pm 0,15	11,0 \pm 0,20	11,0 \pm 0,94	9,6 \pm 0,50
01/09/2015	PRML	6,3 \pm 0,52	4,6 \pm 0,17	4,1 \pm 0,18	11,1 \pm 0,94	9,3 \pm 0,47	9,0 \pm 0,42
07/09/2015	PRML	5,7 \pm 0,97	4,5 \pm 0,22	3,7 \pm 0,10	9,8 \pm 1,54	9,0 \pm 0,31	7,9 \pm 0,19
14/09/2015	FML	4,2 \pm 0,65	3,9 \pm 0,23	3,5 \pm 0,38	7,5 \pm 1,01	7,6 \pm 0,39	7,5 \pm 0,73
21/09/2015	FML	3,2 \pm 0,16	3,0 \pm 0,30	2,7 \pm 0,02	5,8 \pm 0,39	5,9 \pm 0,58	5,9 \pm 0,43
01/10/2015	EST	4,4 \pm 1,13	4,3 \pm 0,22	3,7 \pm 0,24	8,3 \pm 0,69	8,6 \pm 0,23	7,6 \pm 0,25
02/12/2015	EST	5,3 \pm 1,24	5,1 \pm 0,22	4,1 \pm 0,43	8,7 \pm 1,04	8,7 \pm 0,53	7,7 \pm 0,98
04/02/2016	EST	4,2 \pm 0,16	4,3 \pm 0,30	3,3 \pm 0,78	7,0 \pm 0,63	7,7 \pm 0,88	6,2 \pm 1,36
Fecha	Etapa	[Pe-3gl]			[Mv-3gl]		
20/08/2015	FA	12,4 \pm 5,79	15,2 \pm 0,74	14,5 \pm 3,25	75,9 \pm 15,52	77,5 \pm 6,91	76,6 \pm 16,64
24/08/2015	FA	13,5 \pm 0,82	12,4 \pm 1,53	12,1 \pm 0,88	136,9 \pm 0,29	117,7 \pm 13,53	121,5 \pm 12,75
25/08/2015	DE	10,2 \pm 1,12	10,7 \pm 0,90	10,5 \pm 0,49	92,4 \pm 3,20	101,8 \pm 6,44	97,6 \pm 4,70
01/09/2015	PRML	10,2 \pm 1,14	8,6 \pm 0,30	9,6 \pm 0,50	90,3 \pm 7,36	85,2 \pm 2,98	89,3 \pm 0,63
07/09/2015	PRML	8,0 \pm 1,31	8,1 \pm 0,23	7,6 \pm 0,30	75,9 \pm 11,00	78,9 \pm 1,84	75,8 \pm 3,12
14/09/2015	FML	6,1 \pm 0,65	6,4 \pm 0,36	6,9 \pm 0,58	60,0 \pm 6,01	66,6 \pm 3,62	69,7 \pm 6,01
21/09/2015	FML	5,3 \pm 0,28	5,4 \pm 0,31	5,8 \pm 0,52	52,6 \pm 4,91	56,0 \pm 2,33	59,9 \pm 5,25
01/10/2015	EST	7,1 \pm 0,68	8,1 \pm 0,16	7,5 \pm 0,24	88,3 \pm 1,84	94,6 \pm 2,15	87,8 \pm 4,35
02/12/2015	EST	8,5 \pm 0,53	8,7 \pm 1,22	8,9 \pm 0,76	84,2 \pm 5,20	87,1 \pm 7,33	76,9 \pm 15,86
04/02/2016	EST	7,0 \pm 0,82	8,4 \pm 0,44	7,2 \pm 0,60	68,5 \pm 9,73	75,9 \pm 1,08	69,1 \pm 12,22

EN: encubado; FA: fermentación alcohólica; DE: descube; PRML: prefermentación maloláctica; FML: fermentación maloláctica; EST: estabilización

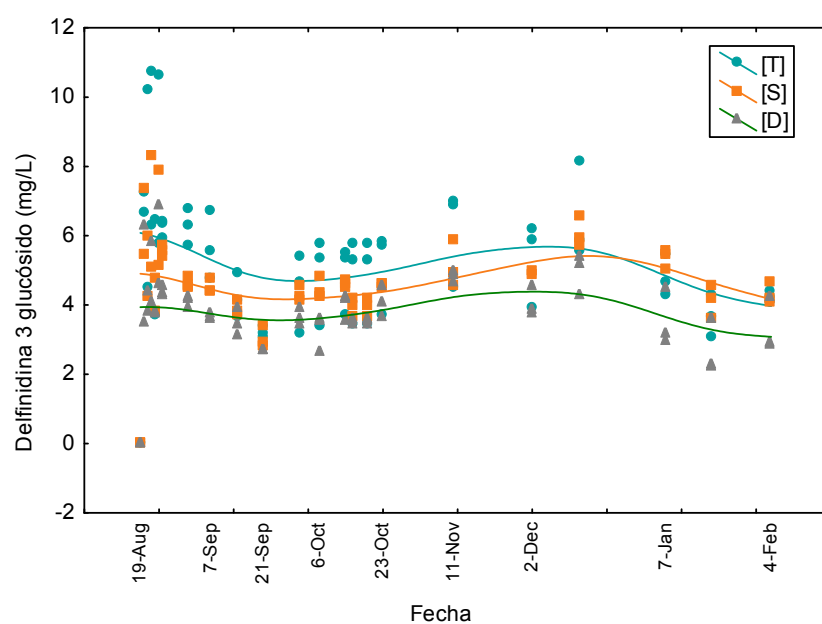


Figura 18: Evolución del contenido en Delfinidina 3-glucósido.

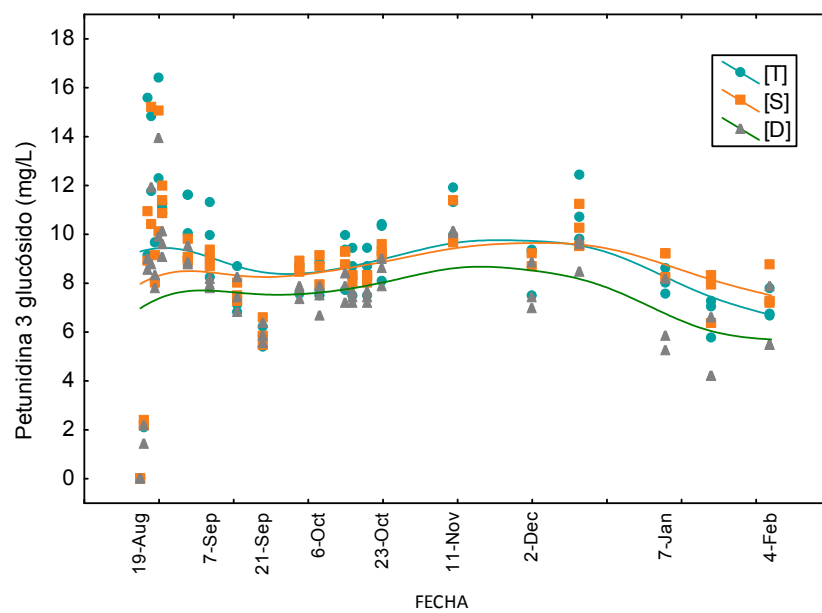


Figura 19: Evolución del contenido en Petunidina 3-glucósido.

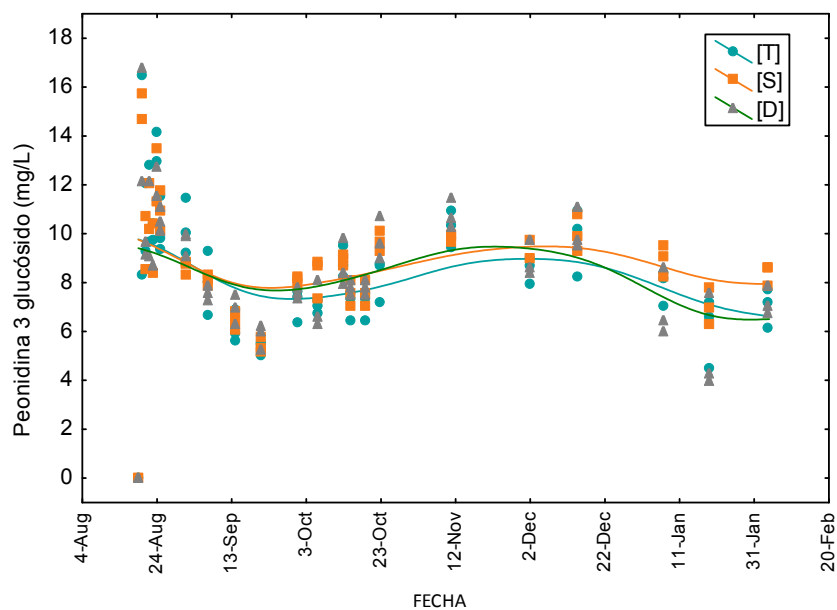


Figura 20: Evolución del contenido en Peonidina 3-glucósido.

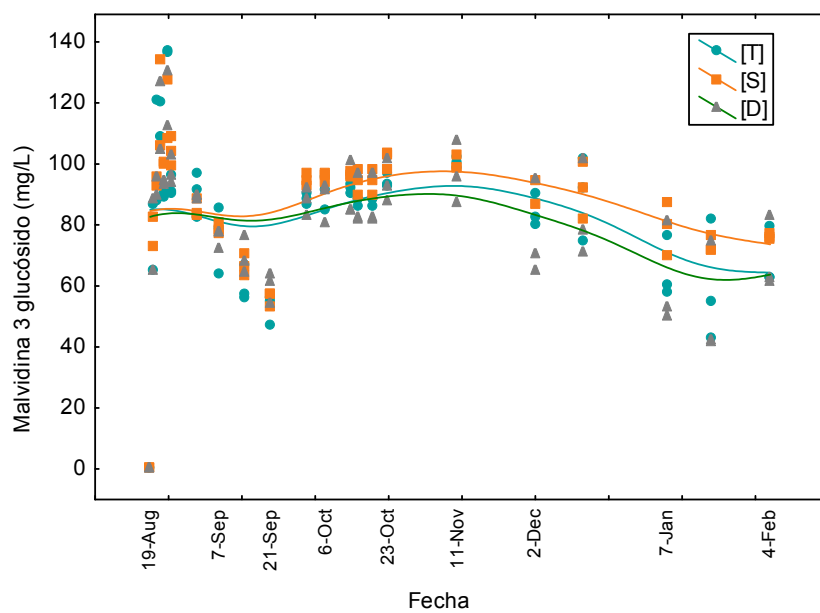


Figura 21: Evolución del contenido en Malvidina 3-glucósido.

En las Tablas 7 y 8 se muestran los datos correspondientes a los monómeros antocíánicos individuales en sus formas acetiladas y cumariladas.

Tabla 7: Valores de compuestos Monoglucósidos acetilados (media \pm SD) de vino Syrah

Fecha	Etapa	Monoglucósidos acetilados (mg/L)								
		[Pt-3-ac]			[Pe-3-ac]			[Mv-3-ac]		
20/08/2015	FA	3,16 \pm 0,71	2,96 \pm 0,14	2,78 \pm 0,70	6,14 \pm 2,47	7,21 \pm 0,31	7,01 \pm 1,47	35,88 \pm 12,74	40,26 \pm 3,54	41,14 \pm 9,63
24/08/2015	FA	6,69 \pm 0,57	6,14 \pm 0,65	6,54 \pm 1,25	9,95 \pm 1,21	10,23 \pm 1,36	11,15 \pm 0,79	67,92 \pm 11,22	64,68 \pm 7,12	69,81 \pm 6,67
25/08/2015	DE	4,80 \pm 0,56	5,52 \pm 0,31	4,92 \pm 0,27	10,34 \pm 1,06	11,36 \pm 0,64	11,49 \pm 0,36	48,66 \pm 0,31	56,16 \pm 3,49	57,27 \pm 3,07
01/09/2015	PRML	4,93 \pm 0,37	4,57 \pm 0,45	5,01 \pm 0,19	10,79 \pm 0,48	10,60 \pm 0,66	10,97 \pm 0,93	47,76 \pm 3,88	49,09 \pm 2,23	52,81 \pm 0,42
07/09/2015	PRML	5,03 \pm 1,02	4,61 \pm 0,32	4,56 \pm 0,19	8,63 \pm 1,07	9,69 \pm 0,33	9,21 \pm 0,50	41,74 \pm 5,59	45,72 \pm 1,29	46,14 \pm 1,98
14/09/2015	FML	4,31 \pm 0,59	4,70 \pm 0,38	4,73 \pm 0,66	7,12 \pm 1,43	8,13 \pm 0,65	8,67 \pm 0,77	32,84 \pm 3,83	38,52 \pm 2,30	42,11 \pm 4,49
21/09/2015	FML	4,25 \pm 0,29	3,51 \pm 0,28	3,96 \pm 0,09	7,12 \pm 0,42	6,60 \pm 0,36	7,82 \pm 1,22	28,05 \pm 3,80	30,94 \pm 1,63	34,76 \pm 3,57
01/10/2015	EST	5,59 \pm 0,38	5,52 \pm 0,10	5,61 \pm 0,08	8,85 \pm 0,74	9,88 \pm 0,15	9,41 \pm 0,51	48,86 \pm 3,89	53,03 \pm 1,06	51,24 \pm 2,89
02/12/2015	EST	4,06 \pm 0,13	4,34 \pm 0,65	4,18 \pm 0,83	6,88 \pm 1,03	7,21 \pm 1,09	7,66 \pm 0,97	48,12 \pm 5,80	49,76 \pm 3,81	46,59 \pm 8,64
04/02/2016	EST	4,55 \pm 0,50	5,56 \pm 0,26	4,84 \pm 0,36	8,07 \pm 0,28	7,89 \pm 0,65	8,15 \pm 0,39	41,40 \pm 5,87	44,44 \pm 1,33	42,26 \pm 5,99

EN: encubado; FA: fermentación alcohólica; DE: descube; PRML: prefermentación maloláctica; FML: fermentación maloláctica; EST: estabilización

En los monoglucósidos acetilados se da la misma circunstancia que en los no acilados: mayores valores de Malvidin 3-acetilglucósido, con mínimas diferencias en los tres ensayos. Los perfiles de Petunidin 3-acetilglucósido y Peonidin 3-acetilglucósido son muy similares.

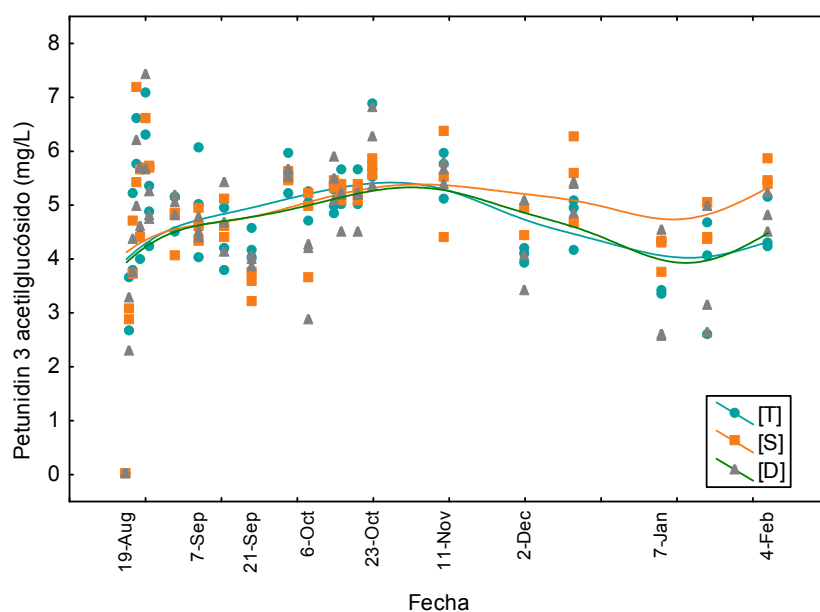


Figura 22: Evolución del contenido en Petunidin 3-acetilglucósido.

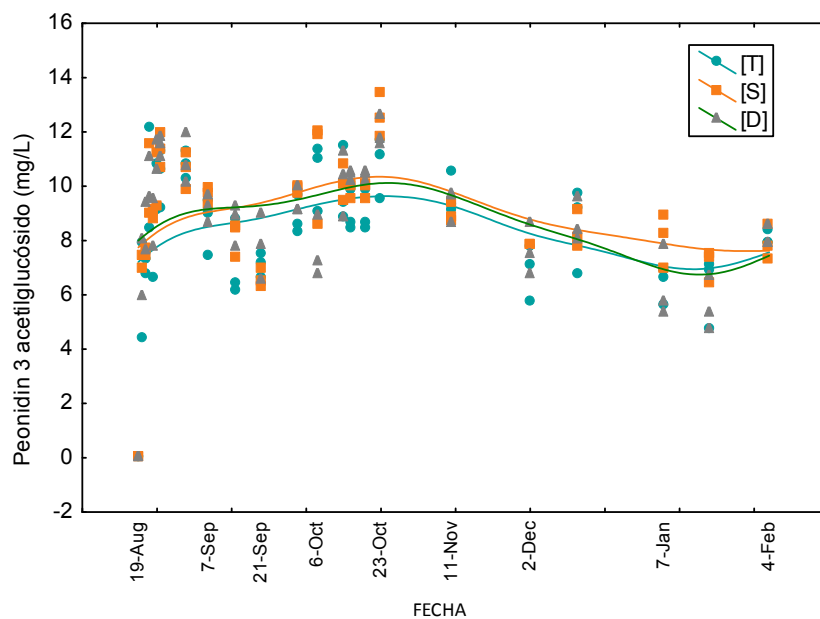


Figura 23: Evolución del contenido en Peonidin 3-acetilglucósido.

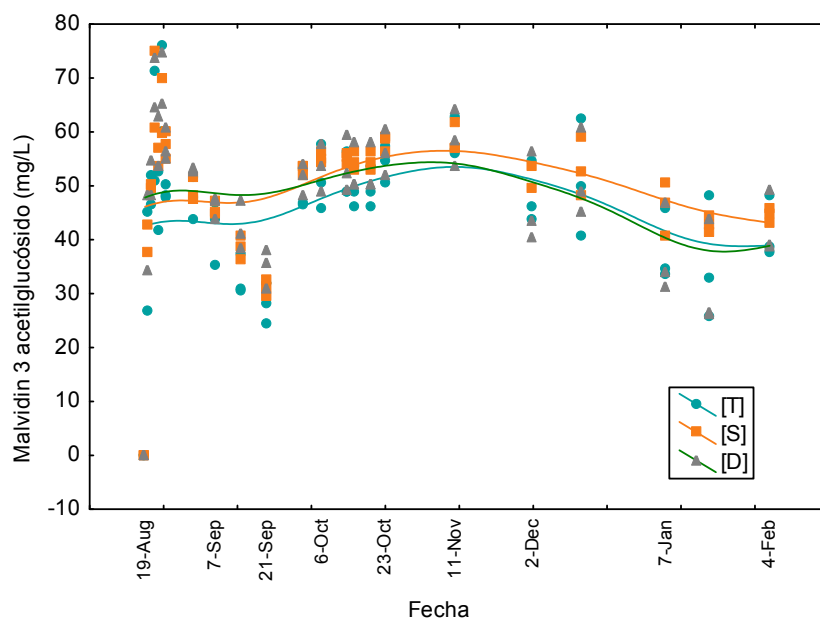


Figura 24: Evolución del contenido en Malvidin 3-acetilglucósido.

Tabla 8: Valores de compuestos monoglucosidos p-cumarilados (media \pm SD) de vino Syrah

Fecha	Etapa	Monoglucosidos p-cumarilados (mg/L)								
		[Pt-3-cum]			[Pe-3-cum]			[Mv-3-cum]		
20/08/2015	FA	1,95 \pm 0,30	2,31 \pm 0,03	1,93 \pm 0,73	1,99 \pm 0,64	2,87 \pm 0,05	2,47 \pm 1,13	9,80 \pm 2,99	14,76 \pm 1,74	13,23 \pm 7,03
24/08/2015	FA	8,62 \pm 0,44	7,03 \pm 1,03	8,00 \pm 0,94	6,44 \pm 0,57	7,69 \pm 1,13	7,54 \pm 0,74	35,84 \pm 4,70	30,80 \pm 4,36	31,41 \pm 1,87
25/08/2015	DE	5,37 \pm 0,18	5,96 \pm 0,45	5,40 \pm 0,38	6,03 \pm 0,32	7,06 \pm 0,55	6,74 \pm 0,36	21,12 \pm 1,14	25,39 \pm 2,07	24,56 \pm 1,41
01/09/2015	PRML	5,71 \pm 0,58	5,19 \pm 0,53	5,09 \pm 0,38	5,56 \pm 0,28	5,42 \pm 0,62	5,58 \pm 0,56	18,98 \pm 0,89	19,12 \pm 2,50	19,83 \pm 1,63
07/09/2015	PRML	5,00 \pm 0,74	4,75 \pm 0,65	4,68 \pm 0,30	5,18 \pm 0,99	5,15 \pm 0,48	5,18 \pm 0,24	17,03 \pm 3,15	17,62 \pm 1,64	18,06 \pm 1,33
14/09/2015	FML	4,23 \pm 0,95	4,14 \pm 0,40	4,42 \pm 0,58	4,43 \pm 0,78	4,72 \pm 0,37	4,98 \pm 0,66	13,48 \pm 2,27	15,14 \pm 1,37	16,54 \pm 2,83
21/09/2015	FML	3,56 \pm 0,24	3,52 \pm 0,29	3,79 \pm 0,26	4,16 \pm 0,04	4,33 \pm 0,38	4,71 \pm 0,35	12,79 \pm 0,40	13,65 \pm 0,86	15,09 \pm 1,33
01/10/2015	EST	5,85 \pm 0,35	6,47 \pm 0,29	5,89 \pm 0,45	5,97 \pm 0,61	6,86 \pm 0,03	6,37 \pm 0,41	23,62 \pm 1,87	27,40 \pm 0,82	24,36 \pm 2,01
02/12/2015	EST	5,43 \pm 0,49	5,78 \pm 0,28	5,32 \pm 0,73	3,88 \pm 0,08	5,55 \pm 0,36	5,39 \pm 0,42	22,18 \pm 3,09	25,38 \pm 2,26	22,25 \pm 4,96
04/02/2016	EST	6,24 \pm 1,04	7,04 \pm 0,29	6,79 \pm 0,32	5,96 \pm 0,29	5,73 \pm 0,32	5,66 \pm 0,61	20,64 \pm 4,98	22,98 \pm 1,41	20,37 \pm 1,18

EN: encubado; FA: fermentación alcohólica; DE: descube; PRML: prefermentación maloláctica; FML: fermentación maloláctica; EST: estabilización

De la misma manera, se observa en los monómeros cumarilados un aumento en Malvidin 3-cumarilglucósido por encima de Petunidin 3-cumarilglucósido y Peonidin 3-cumarilglucósido.

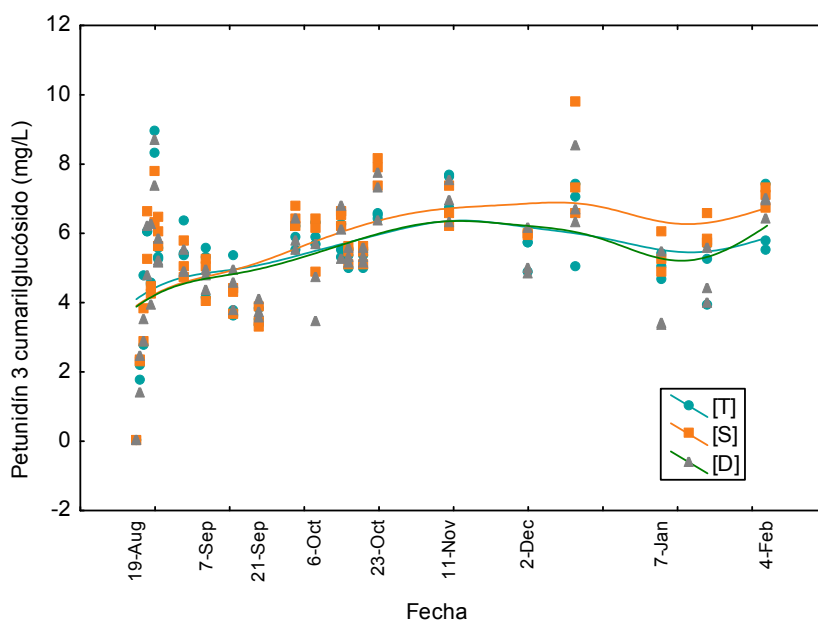


Figura 25: Evolución del contenido en Petunidin 3-cumarilglucósido.

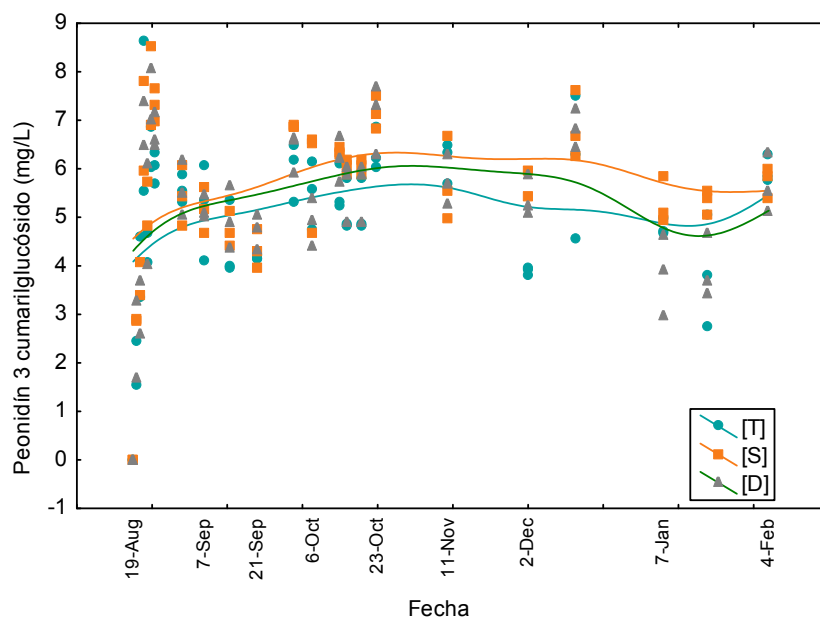


Figura 26: Evolución del contenido en Peonidin 3-cumarilglucósido.

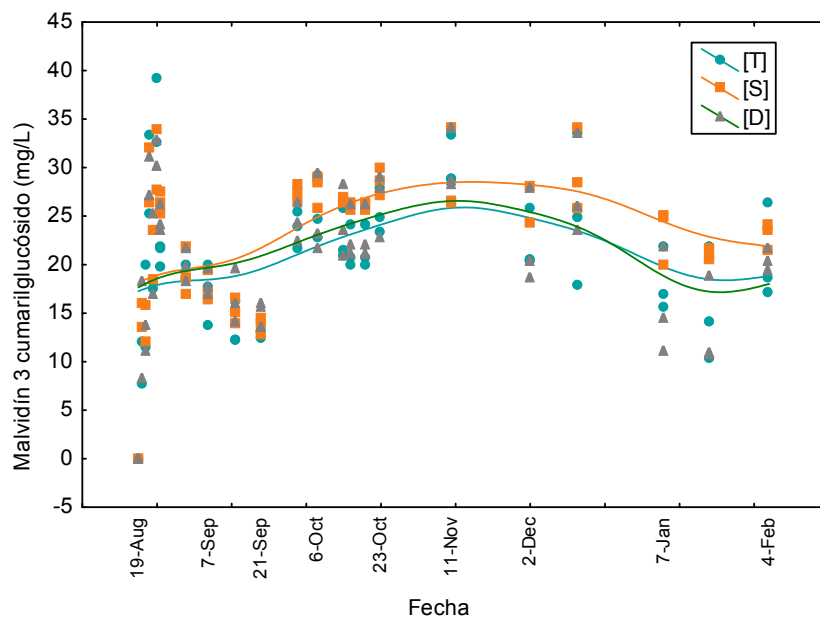


Figura 27: Evolución del contenido en Malvidin 3-cumarilglucósido.

4.2.3. Flavanoles

Dentro de los fenoles del vino, los flavanoles pertenecen al grupo de derivados flavonoideos, con una estructura formada por dos anillos bencénicos unidos por un heterociclo oxigenado saturado. Pueden encontrarse los isómeros (+) y (-) de catequina y epicatequina. Participan en la estabilización del color por polimerización con los antocianos, dando lugar a estructuras más resistentes a la degradación y menos sensibles a la decoloración (*Rivas-Gonzalo et al.*, 1995), por lo que su formación es de gran interés.

Tabla 9: Valores de Flavanoles Totales (media \pm SD) para cada ensayo en las diferentes etapas de la vinificación.

Fecha	Etapas	Flavanoles Totales (mg/L)		
		[T]	[S]	[D]
19/08/2015	EN	93,10 \pm 25,37	109,82 \pm 4,29	87,67 \pm 35,79
20/08/2015	FA	135,55 \pm 7,23	156,58 \pm 4,44	119,72 \pm 31,81
21/08/2015	FA	229,16 \pm 57,81	159,51 \pm 8,38	181,77 \pm 45,15
22/08/2015	FA	328,51 \pm 79,41	297,11 \pm 33,15	288,81 \pm 21,72
23/08/2015	FA	349,78 \pm 68,59	285,90 \pm 28,12	269,03 \pm 25,11
24/08/2015	FA	331,02 \pm 38,11	334,51 \pm 4,85	301,42 \pm 24,54
25/08/2015	DE	335,34 \pm 56,60	347,39 \pm 29,88	335,85 \pm 14,23
01/09/2015	PRML	357,67 \pm 14,88	364,73 \pm 32,93	347,39 \pm 33,69
07/09/2015	PRML	302,99 \pm 28,18	305,56 \pm 51,83	317,80 \pm 71,03
14/09/2015	FML	309,00 \pm 38,20	294,40 \pm 44,97	280,64 \pm 28,55
21/09/2015	FML	277,18 \pm 51,94	266,67 \pm 2,94	279,71 \pm 31,48
01/10/2015	EST	316,69 \pm 20,46	366,61 \pm 24,21	382,76 \pm 15,17
06/10/2015	EST	389,59 \pm 64,34	385,57 \pm 37,51	358,63 \pm 16,42
13/10/2015	EST	425,11 \pm 79,11	497,38 \pm 28,93	455,69 \pm 52,06
15/10/2015	EST	398,27 \pm 38,82	405,66 \pm 28,95	396,64 \pm 17,77
19/10/2015	EST	365,40 \pm 46,87	406,62 \pm 28,74	371,23 \pm 39,51
23/10/2015	EST	373,91 \pm 43,01	384,81 \pm 23,73	357,41 \pm 25,62
29/10/2015	EST	362,66 \pm 50,79	412,08 \pm 33,69	403,48 \pm 23,12
11/11/2015	EST	322,42 \pm 22,89	414,05 \pm 57,16	330,62 \pm 19,19
18/11/2015	EST	451,47 \pm 27,91	469,91 \pm 35,88	434,82 \pm 22,42
02/12/2015	EST	391,18 \pm 38,93	434,64 \pm 38,45	356,12 \pm 40,14
15/12/2015	EST	468,01 \pm 56,46	474,46 \pm 25,97	455,84 \pm 40,03
07/01/2016	EST	466,71 \pm 72,63	533,81 \pm 32,92	442,91 \pm 59,22
19/01/2016	EST	438,03 \pm 100,03	498,38 \pm 44,05	459,05 \pm 54,48
04/02/2016	EST	467,62 \pm 57,62	526,64 \pm 42,32	479,39 \pm 20,04

EN: encubado; FA: fermentación alcohólica; DE: descube; PRML: prefermentación maloláctica; FML: fermentación maloláctica; EST: estabilización

En la Tabla 9 se muestran los resultados correspondientes al contenido en **Flavanoles Totales** (FlaT), expresados en catequina (mg/L), para cada uno de los ensayos ([T]: Testigo, [S]: Simple, [D]: Doble). Y en la Figura 28 se observa el perfil de evolución durante todo el proceso de vinificación, con una tendencia ascendente. En general, los correspondientes valores para el ensayo de adición simple de semillas [S] se encuentran ligeramente por encima en prácticamente todo el proceso de vinificación.

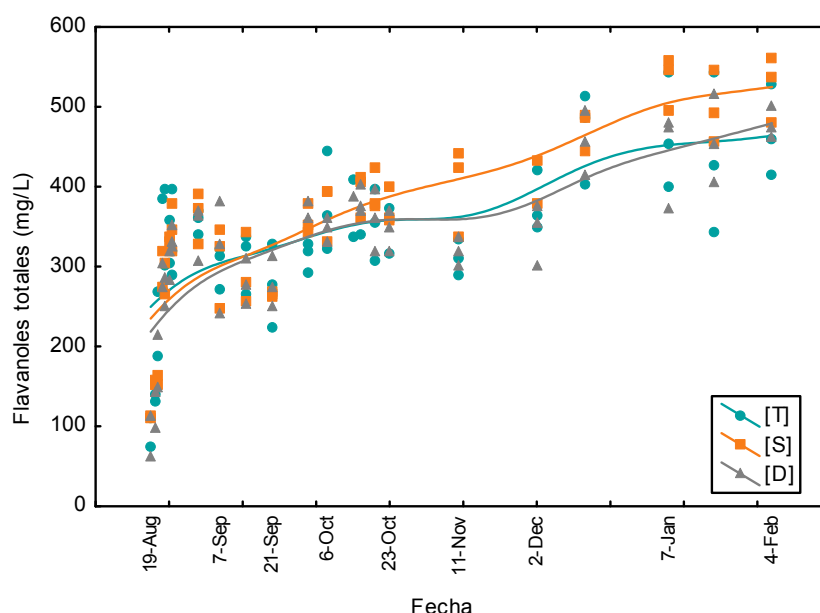


Figura 28: Evolución del contenido en Flavanoles Totales para cada ensayo a lo largo de la vinificación.

4.2.4. Copigmentación

Tal como se ha indicado en el apartado 1.5.1 de esta memoria, el color del vino tinto depende del contenido en pigmentos, los antocianos, y de su relación con los copigmentos, ya que se producen procesos de copigmentación que van a determinar tanto el color como su estabilidad.

Tabla 10: Valores de Antocianos Copigmentados (media \pm SD) de vino Syrah.

Fecha	Etapa	Antocianos Copigmentados (%)		
		[T]	[S]	[D]
19/08/2015	FA	80,37 \pm 0,18	80,43 \pm 4,65	74,43 \pm 0,48
20/08/2015	FA	46,70 \pm 3,57	53,75 \pm 4,96	54,19 \pm 2,55
21/08/2015	FA	25,62 \pm 7,22	31,00 \pm 1,63	26,11 \pm 0,72
22/08/2015	FA	37,18 \pm 6,69	42,77 \pm 1,04	43,17 \pm 0,09
23/08/2015	FA	38,13 \pm 4,98	49,98 \pm 12,86	40,77 \pm 4,91
24/08/2015	FA	42,31 \pm 2,72	34,55 \pm 10,85	37,75 \pm 0,12
25/08/2015	DE	22,84 \pm 1,11	21,79 \pm 3,37	24,03 \pm 0,85
01/09/2015	PRML	28,12 \pm 7,81	34,05 \pm 5,05	26,81 \pm 8,20
07/09/2015	PRML	14,13 \pm 3,89	16,24 \pm 2,02	11,25 \pm 2,53
14/09/2015	FML	28,49 \pm 3,77	29,83 \pm 0,95	31,71 \pm 1,91
21/09/2015	FML	17,26 \pm 1,87	22,85 \pm 2,23	17,44 \pm 7,24
01/10/2015	EST	28,21 \pm 4,09	28,57 \pm 1,38	25,25 \pm 2,32
06/10/2015	EST	32,92 \pm 7,94	35,39 \pm 4,67	30,37 \pm 5,53
13/10/2015	EST	34,26 \pm 11,85	41,55 \pm 4,80	37,08 \pm 2,10
15/10/2015	EST	28,79 \pm 1,13	30,63 \pm 1,49	25,94 \pm 2,27
19/10/2015	EST	8,86 \pm 0,76	11,90 \pm 0,45	8,74 \pm 3,77
23/10/2015	EST	21,14 \pm 5,73	27,43 \pm 1,88	26,62 \pm 1,83
11/11/2015	EST	32,66 \pm 2,45	35,75 \pm 1,62	32,55 \pm 3,20
02/12/2015	EST	28,88 \pm 3,11	30,51 \pm 1,91	27,40 \pm 2,34
15/12/2015	EST	8,72 \pm 13,33	9,31 \pm 12,45	12,73 \pm 4,78
07/01/2016	EST	21,66 \pm 2,26	20,79 \pm 0,73	23,65 \pm 7,19
19/01/2016	EST	26,34 \pm 6,25	29,43 \pm 2,93	27,72 \pm 5,12
04/02/2016	EST	16,27 \pm 1,94	22,39 \pm 1,57	18,33 \pm 6,37

EN: encubado; FA: fermentación alcohólica; DE: descube; PRML: prefermentación maloláctica; FML: fermentación maloláctica; EST: estabilización

La Tabla 10 muestra los valores de Antocianos Copigmentados (%) en el vino Syrah, por cada ensayo y a lo largo de las etapas de vinificación. En estudios realizados en uvas (*Hermosín et al.*, 2003), se ha observado que a medida que aumenta la concentración de compuestos polifenólicos durante la maduración se da un aumento del porcentaje de antocianos copigmentados. Esto puede justificar que el valor más alto señalado aparezca en el primer día de fermentación. El estudio antes citado indica también que la presencia de etanol en los vinos puede contribuir a la disociación de los complejos formados por

copigmentación, disminuyendo el porcentaje de copigmentación, y dando lugar de nuevo a antocianos libres.

El porcentaje de antocianos copigmentados que se representa en la Figura 29, muestra una pequeña diferencia entre los ensayos. Frente a lo que cabría esperar, los valores fueron más altos en el ensayo de adición simple de semillas [S], que en el de adición doble [D]. Esto podría explicarse considerando que la copigmentación alcanza unos valores máximos (que podrían haberse alcanzado en el ensayo de adición simple de semillas) y que, superados estos valores, ocurren procesos de condensación y polimerización en el vino que retiran antocianos copigmentados y quedan más antocianos libres (*Rivas-Gonzalo et al.*, 2003).

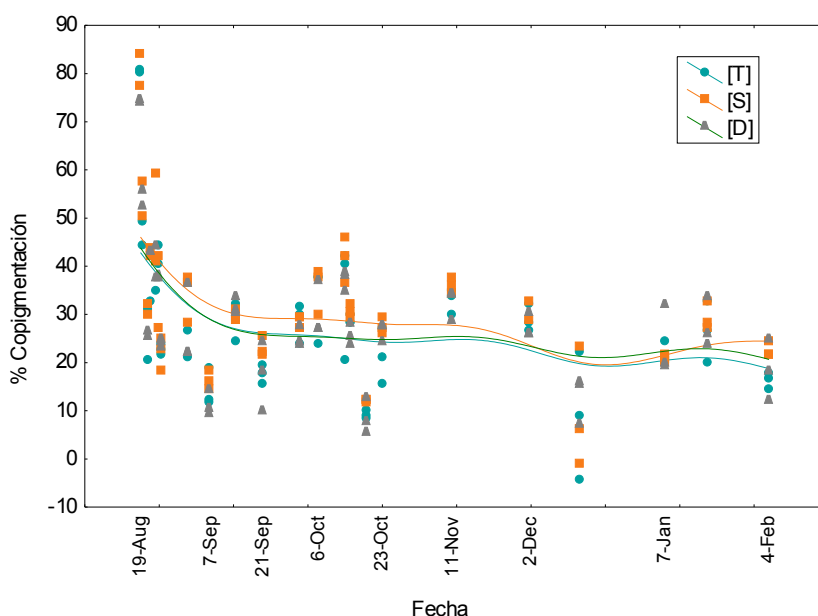


Figura 29: Evolución del porcentaje de Antocianos Copigmentados.

Los pigmentos poliméricos son macromoléculas que resultan de la interacción entre las antocianinas y otros compuestos, especialmente flavan-3-oles como catequinas y procianidinas (taninos condensados). Según muestran algunos autores, las reacciones de copigmentación de antocianos son el primer paso hacia la formación de los pigmentos poliméricos estables (Liao et al., 1992).

En la Tabla 11 se dan los valores de Pigmentos Poliméricos (%) por ensayo, a lo largo de la vinificación. En la evolución de estos valores, de forma gráfica en Figura 30, se observa que el valor más alto se da en el ensayo testigo (vino elaborado sin adición de semillas), en la etapa de fermentación maloláctica. En general, los valores son bastante similares en los tres ensayos hasta que, a partir de la fermentación maloláctica, y durante toda la fase de estabilización, se produce una diferenciación entre ellos, manteniéndose siempre por debajo el ensayo de adición simple [S]. Esto puede deberse a que en el ensayo [S] predomine el fenómeno de copigmentación sobre el de polimerización.

Tabla 11: Valores de Pigmentos Poliméricos (media \pm SD) de vino Syrah.

Fecha	Etapa	Pigmentos Poliméricos (%)		
		[T]	[S]	[D]
19/08/2015	FA	8,64 \pm 0,57	11,00 \pm 0,96	12,00 \pm 0,01
20/08/2015	FA	13,81 \pm 0,10	10,83 \pm 0,67	12,78 \pm 2,97
21/08/2015	FA	31,86 \pm 0,80	30,40 \pm 0,05	32,33 \pm 3,03
22/08/2015	FA	30,19 \pm 0,36	29,03 \pm 0,69	29,12 \pm 1,36
23/08/2015	FA	33,02 \pm 0,27	30,57 \pm 1,60	37,53 \pm 0,20
24/08/2015	FA	26,54 \pm 0,29	31,83 \pm 0,02	33,36 \pm 1,69
25/08/2015	DE	32,25 \pm 0,59	31,55 \pm 0,97	31,13 \pm 0,11
01/09/2015	PRML	40,48 \pm 0,48	37,55 \pm 0,86	38,63 \pm 1,95
07/09/2015	PRML	36,71 \pm 0,53	34,52 \pm 0,58	34,68 \pm 0,42
14/09/2015	FML	36,61 \pm 5,48	35,67 \pm 0,66	34,54 \pm 1,50
21/09/2015	FML	51,61 \pm 0,86	45,45 \pm 1,77	46,14 \pm 1,06
01/10/2015	EST	36,41 \pm 2,39	31,50 \pm 0,64	35,05 \pm 1,84
06/10/2015	EST	35,63 \pm 0,58	30,90 \pm 0,29	33,55 \pm 1,54
13/10/2015	EST	38,48 \pm 4,22	33,07 \pm 0,18	24,74 \pm 21,43
15/10/2015	EST	35,88 \pm 1,56	30,50 \pm 0,29	34,60 \pm 1,91
19/10/2015	EST	36,29 \pm 1,74	31,65 \pm 0,55	36,13 \pm 3,94
23/10/2015	EST	38,43 \pm 0,73	33,03 \pm 0,59	36,75 \pm 2,21
11/11/2015	EST	39,63 \pm 0,91	35,83 \pm 1,16	38,69 \pm 2,83
02/12/2015	EST	41,72 \pm 1,92	37,36 \pm 1,72	41,08 \pm 4,48
15/12/2015	EST	43,81 \pm 0,89	41,12 \pm 0,75	44,10 \pm 5,85
07/01/2016	EST	46,59 \pm 4,62	40,82 \pm 3,18	47,20 \pm 5,96
19/01/2016	EST	45,55 \pm 4,85	39,30 \pm 2,39	43,74 \pm 6,66
04/02/2016	EST	47,75 \pm 3,70	41,94 \pm 1,17	45,70 \pm 5,27

EN: encubado; FA: fermentación alcohólica; DE: descube; PRML: prefermentación maloláctica; FML: fermentación maloláctica; EST: estabilización

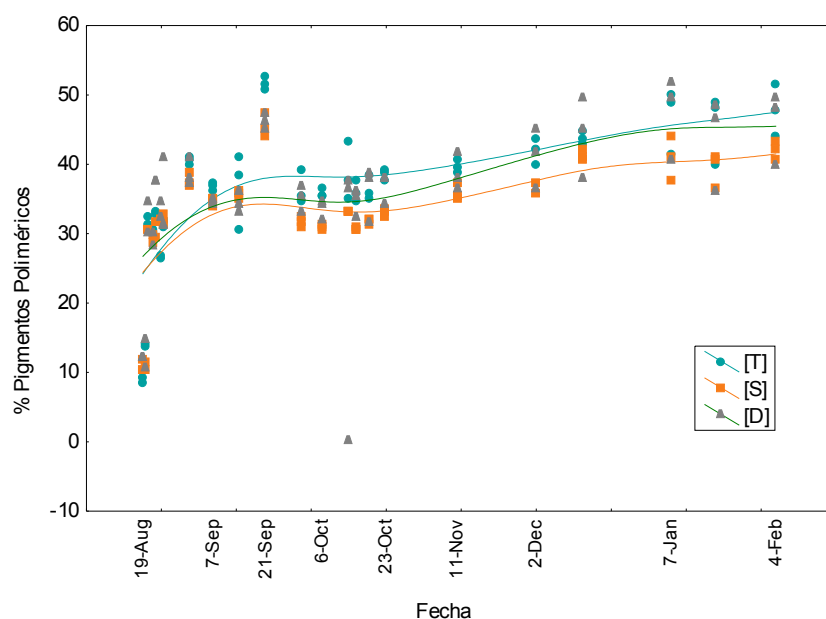


Figura 30: Evolución del porcentaje de Pigmentos Poliméricos.

4.3. Estudio Colorimétrico.

Se realizó el seguimiento del color de los vinos elaborados con el fin de determinar el efecto que produce la diferente elaboración, mediante la adición de semillas, sobre esta importante característica de la calidad del vino, especialmente en el caso de los tintos.

El estudio se basó en la medida espectrofotométrica del color de los vinos considerando los tres ensayos a lo largo de la vinificación (mosto y vino). En este apartado se evalúan las características colorimétricas globales así como, de manera independiente, cada uno de los tres parámetros psicofísicos del color, definidos por el espacio de color CIELAB.

En primer lugar, se muestran los resultados correspondientes a los parámetros colorimétricos independientes: la claridad (L^*), el croma (C^*_{ab}) y el tono (h_{ab}). Respecto al primero, la **claridad (L^*)** (Tabla 12), se encontró que este parámetro osciló desde las 85 unidades del mosto al inicio del encubado hasta valores más oscuros, cercanos a 60 unidades CIELAB, en la etapa de estabilización del vino.

Al inicio de la etapa de fermentación se observa un alto valor de la desviación estándar debido al amplio intervalo de valores de claridad entre las muestras por la variabilidad del momento en el que se inicia la extracción de pigmentos.

Tabla 12: Valores de claridad de los vinos de Syrah (media \pm SD) para cada ensayo en cada etapa de vinificación.

Fecha	Etapa	Claridad (L*)		
		[T]	[S]	[D]
19/08/2015	EN	83,38 \pm 0,97	85,64 \pm 3,97	83,92 \pm 0,71
20/08/2015	FA	76,72 \pm 9,87	75,17 \pm 1,04	74,05 \pm 3,81
21/08/2015	FA	70,37 \pm 2,84	70,92 \pm 3,27	73,38 \pm 0,70
22/08/2015	FA	65,74 \pm 2,55	66,41 \pm 3,47	65,22 \pm 4,13
23/08/2015	FA	69,35 \pm 2,51	73,44 \pm 3,68	65,20 \pm 3,07
24/08/2015	FA	81,76 \pm 0,85	68,52 \pm 5,89	67,38 \pm 3,07
25/08/2015	DE	68,25 \pm 0,53	67,90 \pm 0,34	67,83 \pm 0,83
01/09/2015	PRML	65,57 \pm 0,41	67,04 \pm 0,54	65,62 \pm 0,10
07/09/2015	PRML	66,94 \pm 4,01	68,05 \pm 0,21	67,98 \pm 0,61
14/09/2015	FML	71,30 \pm 2,80	70,55 \pm 1,07	68,61 \pm 2,31
21/09/2015	FML	73,67 \pm 1,53	74,11 \pm 1,03	73,03 \pm 0,30
01/10/2015	EST	77,68 \pm 3,25	80,83 \pm 0,38	76,63 \pm 2,25
06/10/2015	EST	78,20 \pm 0,18	80,83 \pm 0,19	78,10 \pm 1,88
13/10/2015	EST	76,78 \pm 1,07	80,18 \pm 0,31	74,49 \pm 4,13
15/10/2015	EST	76,93 \pm 2,18	80,79 \pm 0,49	76,41 \pm 2,76
19/10/2015	EST	75,88 \pm 1,92	80,43 \pm 0,16	75,26 \pm 3,87
23/10/2015	EST	74,11 \pm 1,60	79,05 \pm 0,74	73,67 \pm 4,23
29/10/2015	EST	76,85 \pm 0,25	79,00 \pm 0,34	77,54 \pm 2,36
11/11/2015	EST	66,49 \pm 0,71	69,24 \pm 3,62	66,37 \pm 4,06
18/11/2015	EST	68,71 \pm 1,69	71,98 \pm 2,81	68,10 \pm 5,61
02/12/2015	EST	64,85 \pm 2,88	66,88 \pm 2,94	64,43 \pm 3,92
15/12/2015	EST	63,64 \pm 2,37	66,12 \pm 2,18	63,85 \pm 2,62
07/01/2016	EST	61,83 \pm 1,43	64,79 \pm 2,32	62,99 \pm 1,95
19/01/2016	EST	68,27 \pm 3,81	73,11 \pm 4,95	69,44 \pm 0,74
04/02/2016	EST	68,00 \pm 3,59	68,96 \pm 4,09	70,22 \pm 2,27

EN: encubado; FA: fermentación alcohólica; DE: descube; PRML: prefermentación maloláctica; FML: fermentación maloláctica; EST: estabilización

En la Figura 31 se muestra gráficamente la evolución de la claridad (L^*). En los tres ensayos se observa un rápido descenso durante la fermentación alcohólica (FA), es decir, el mosto se va haciendo más oscuro (menos claro) a medida que se van extrayendo los pigmentos contenidos en las partes sólidas de la uva, ayudado por la aparición del alcohol.

Se observa también que este parámetro muestra valores más elevados en la etapa donde se realizó un sulfitado (18/08/15, 21/09/15, 22/09/15, 28/09/15, 11/11/15, 24/12/15, 19/01/16, 11/02/16, 16/02/16, 07/03/16), alcanzando aproximados a 82 unidades CIELAB. Esto es debido a que el anhídrido sulfuroso se combina con los antocianos produciendo una pérdida de color que se traduce, de manera más notable, en un aumento de la claridad y una reducción del croma. En el caso del ensayo testigo y el de adición doble de semillas se dieron valores menores de claridad que en el ensayo de adición simple de semillas.

Otras prácticas enológicas, como el trasiego de los vinos, pueden producir también ligeros aumentos de la claridad.

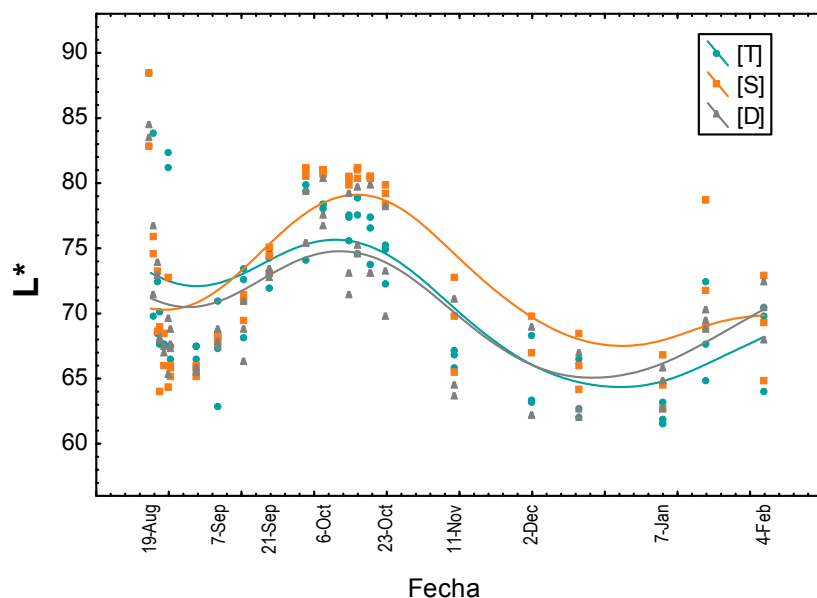


Figura 31: Evolución de la Claridad L^* durante la vinificación, para cada ensayo

Tabla 13: Valores de croma de los vinos de Syrah (media \pm SD) de cada ensayo en las diferentes etapas de la vinificación

Fecha	Etapa	Croma (C^*_{ab})		
		[T]	[S]	[D]
19/08/2015	EN	19,24 \pm 2,23	16,28 \pm 4,81	17,88 \pm 0,44
20/08/2015	FA	27,22 \pm 11,84	31,62 \pm 1,09	31,00 \pm 6,73
21/08/2015	FA	34,41 \pm 3,01	33,58 \pm 4,11	30,12 \pm 1,90
22/08/2015	FA	39,16 \pm 2,90	38,56 \pm 3,78	39,12 \pm 5,56
23/08/2015	FA	34,54 \pm 2,91	28,9 \pm 3,43	37,64 \pm 4,14
24/08/2015	FA	35,50 \pm 1,34	34,82 \pm 6,61	33,98 \pm 7,38
25/08/2015	DE	36,07 \pm 0,54	36,64 \pm 0,44	36,34 \pm 0,76
01/09/2015	PRML	37,03 \pm 0,40	35,85 \pm 0,48	37,02 \pm 0,11
07/09/2015	PRML	36,38 \pm 3,74	35,46 \pm 0,53	35,46 \pm 0,61
14/09/2015	FML	29,91 \pm 3,00	31,37 \pm 1,04	33,13 \pm 2,28
21/09/2015	FML	24,70 \pm 1,40	25,48 \pm 1,18	26,34 \pm 0,54
01/10/2015	EST	21,70 \pm 3,27	18,36 \pm 0,20	22,57 \pm 2,18
06/10/2015	EST	21,26 \pm 0,30	18,69 \pm 0,10	21,48 \pm 1,71
13/10/2015	EST	22,58 \pm 1,14	19,26 \pm 0,30	25,14 \pm 4,16
15/10/2015	EST	22,24 \pm 2,12	18,42 \pm 0,46	22,94 \pm 2,81
19/10/2015	EST	22,81 \pm 1,95	18,48 \pm 0,11	23,79 \pm 3,90
23/10/2015	EST	24,75 \pm 1,63	20,14 \pm 0,77	25,77 \pm 4,39
29/10/2015	EST	22,61 \pm 0,31	20,43 \pm 0,49	22,23 \pm 2,77
11/11/2015	EST	33,22 \pm 0,68	30,97 \pm 4,20	33,78 \pm 4,11
18/11/2015	EST	30,50 \pm 1,76	27,64 \pm 3,12	31,29 \pm 5,67
02/12/2015	EST	35,16 \pm 3,17	33,81 \pm 3,26	35,81 \pm 3,73
15/12/2015	EST	35,91 \pm 2,43	34,21 \pm 2,24	35,84 \pm 1,93
07/01/2016	EST	37,77 \pm 1,16	35,88 \pm 2,31	36,81 \pm 0,85
19/01/2016	EST	31,06 \pm 3,75	27,19 \pm 5,57	30,44 \pm 0,48
04/02/2016	EST	31,06 \pm 3,66	30,90 \pm 4,67	29,21 \pm 2,98

EN: encubado; FA: fermentación alcohólica; DE: descube; PRML: prefermentación maloláctica; FML: fermentación maloláctica; EST: estabilización

La Tabla 13 muestra los valores relativos al **croma (C^*_{ab})**. Este parámetro psicofísico del color indica su viveza, correspondiendo valores bajos a los colores más apagados. En los vinos de los ensayos, el croma osciló entre valores por debajo de las 20 unidades CIELAB para las muestras iniciales (mosto recién encubado) hasta valores cercanos a 40 unidades cuando se ha producido la extracción de los pigmentos antociánicos de los hollejos. Al igual que en la

claridad, se dan valores elevados de la desviación estándar al inicio de la fermentación alcohólica por la desigual extracción de pigmentos.

La evolución del croma (C^*_{ab}) se muestra gráficamente en la Figura 32, donde se observa que alcanza valores máximos en la etapa de fermentación alcohólica (20 a 28 agosto), dándose un descenso acusado durante la fermentación maloláctica y al inicio de la estabilización debido al sulfitado de los vinos en estas etapas, tal como se ha comentado en el apartado de la claridad. Finalmente, en la fase de estabilización, se da un ligero ascenso del croma, mostrándose un color más vivo, hasta alcanzar valores similares y más o menos constantes tanto en el testigo como en los ensayos de adición simple y doble de semillas.

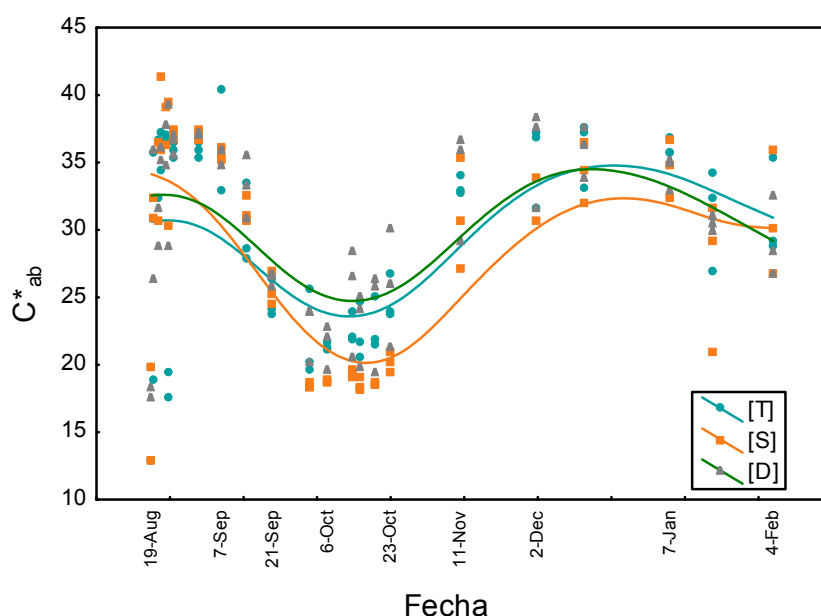


Figura 32: Evolución del Croma (C^*_{ab}) durante la vinificación, para cada ensayo.

El **tono** (h_{ab}) es el parámetro cualitativo del color. La Tabla 14 muestra los valores que toma en el vino Syrah ensayado, a lo largo de la vinificación y para los tres ensayos, y la Figura 33 su evolución. Se observa que, desde el inicio, durante la fermentación y hasta el inicio de la etapa de estabilización, se dan los

valores negativos, correspondientes a tonos rojos con matices azulados. Posteriormente, los vinos van acercándose a valores positivos debido al efecto de compuestos como el sulfuroso y su combinación con los antocianos, y estos valores se corresponden con tonos rojos más netos.

Tras el trasiego, el tono se estabiliza en valores positivos, con variaciones mínimas entre el testigo [T] y los ensayos [S] y [D].

Tabla 14: Valores de tono de los vinos (media \pm SD) de cada ensayo en las diferentes etapas de la vinificación

Fecha	Etapas	Tono (hab)		
		[T]	[S]	[D]
19/08/2015	EN	-11,74 \pm 0,92	-9,58 \pm 0,66	-9,08 \pm 1,81
20/08/2015	FA	-5,47 \pm 3,20	-8,89 \pm 1,37	-6,37 \pm 3,48
21/08/2015	FA	-6,54 \pm 0,81	-6,10 \pm 0,05	-4,59 \pm 0,91
22/08/2015	FA	-7,72 \pm 0,05	-8,62 \pm 0,13	-7,93 \pm 0,34
23/08/2015	FA	-6,78 \pm 0,71	-7,90 \pm 0,61	-3,34 \pm 0,48
24/08/2015	FA	-3,11 \pm 2,19	-7,97 \pm 0,20	-1,37 \pm 9,57
25/08/2015	DE	-9,20 \pm 0,11	-9,85 \pm 0,08	-9,23 \pm 0,13
01/09/2015	PRML	-6,35 \pm 0,11	-7,18 \pm 0,09	-6,54 \pm 0,14
07/09/2015	PRML	-6,43 \pm 0,78	-6,86 \pm 0,51	-6,57 \pm 0,38
14/09/2015	FML	-4,40 \pm 0,39	-5,10 \pm 0,31	-4,80 \pm 0,24
21/09/2015	FML	-2,04 \pm 0,34	-3,87 \pm 0,22	-3,57 \pm 0,79
01/10/2015	EST	6,77 \pm 2,25	9,89 \pm 0,17	4,18 \pm 3,36
06/10/2015	EST	7,15 \pm 0,47	9,08 \pm 0,23	4,50 \pm 2,91
13/10/2015	EST	6,42 \pm 0,21	9,20 \pm 0,67	3,59 \pm 3,99
15/10/2015	EST	5,26 \pm 0,66	8,33 \pm 0,88	2,81 \pm 4,29
19/10/2015	EST	5,46 \pm 1,19	8,43 \pm 1,41	2,92 \pm 4,48
23/10/2015	EST	5,13 \pm 0,94	7,76 \pm 1,17	2,45 \pm 4,48
29/10/2015	EST	4,10 \pm 0,89	6,06 \pm 0,74	3,22 \pm 3,83
11/11/2015	EST	0,56 \pm 0,58	0,98 \pm 2,48	-0,52 \pm 1,84
18/11/2015	EST	1,80 \pm 1,54	2,82 \pm 2,14	1,26 \pm 3,60
02/12/2015	EST	-0,73 \pm 1,56	-1,05 \pm 1,02	-1,01 \pm 0,81
15/12/2015	EST	0,75 \pm 0,85	0,35 \pm 0,28	0,72 \pm 0,81
07/01/2016	EST	0,01 \pm 0,79	-1,10 \pm 0,36	-0,17 \pm 1,33
19/01/2016	EST	2,59 \pm 1,88	4,88 \pm 8,11	1,18 \pm 0,84
04/02/2016	EST	6,11 \pm 3,67	4,74 \pm 4,56	7,18 \pm 4,71

EN: encubado; FA: fermentación alcohólica; DE: descube; PRML: prefermentación maloláctica; FML: fermentación maloláctica; EST: estabilización

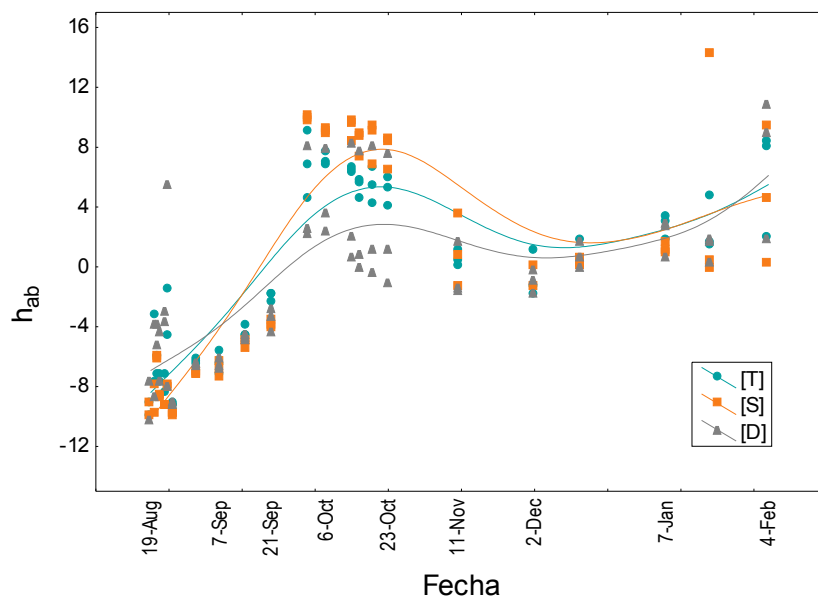


Figura 33: Evolución del Tono (h_{ab}) durante la vinificación, para cada ensayo.

En la evaluación del color de manera más gráfica, se representan las muestras como puntos de color en el diagrama de color (a^*b^*) de CIELAB. Para una mejor exposición de los datos, se comentarán por separado las diferentes etapas de la vinificación.

En la etapa de fermentación alcohólica (Figura 34) no se aprecian diferencias importantes entre los ensayos. Como puede observarse, las muestras correspondientes a los tres ensayos (testigo y con distintas cantidades de semillas) se encuentran localizados muy dispersos en la zona entre 0° y -10° , lo que se corresponde con rojos que tienden a violáceos o azulados. Los puntos que se agrupan hacia una posición central (menores valores de croma) son colores menos vivos de esos mismos tonos.

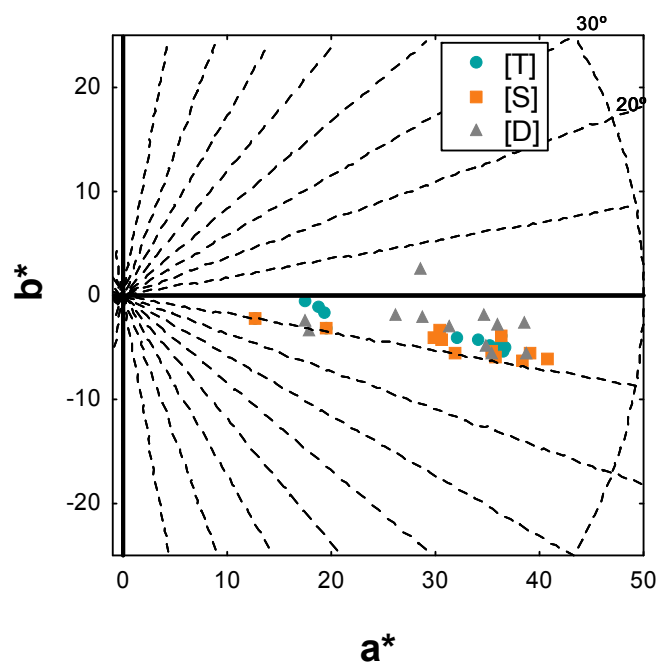


Figura 34: Localización de las muestras en la etapa de Fermentación Alcohólica (FA) en el diagrama (a^*b^*).

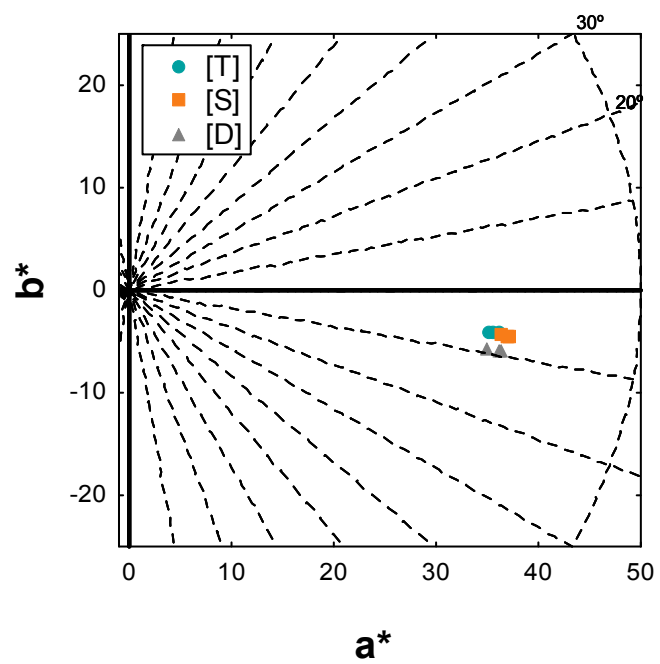


Figura 35: Localización de las muestras en la etapa de Descube (DES) en el diagrama (a^*b^*).

En el diagrama de color (a^*b^*) mostrado en la Figura 35 se encuentran las muestras correspondientes a la etapa de descube. En este caso, las muestras se observan mucho más agrupadas en el diagrama en torno a colores rojo-violáceos o azulados (entre -5° y -10° de ángulo de tono). Esto indica que el descubado ejerce una tendencia hacia la homogeneidad del color de los vinos.

Lo mismo ocurre en la etapa de prefermentación maloláctica (Figura 36), donde los puntos están también agrupados en valores de tono entre -5° y -10° , incluso con menores diferencias entre ellos.

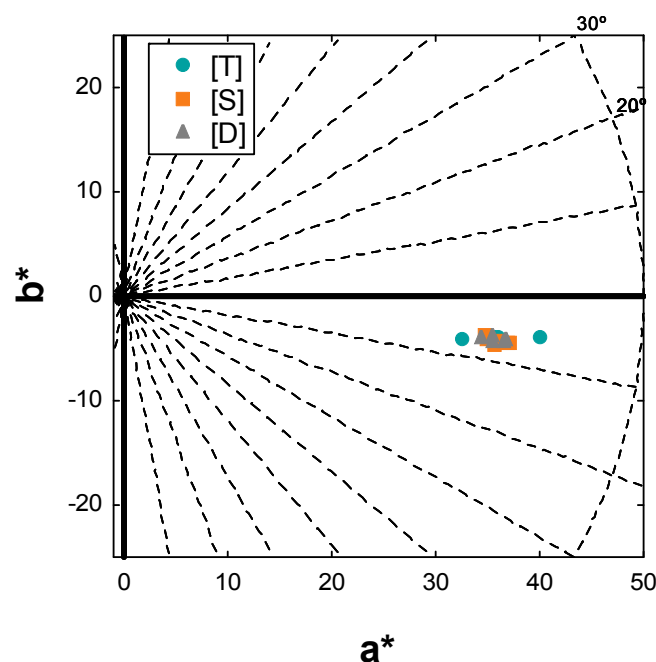


Figura 36: Localización de las muestras en la etapa de Prefermentación Maloláctica (PFM) en el diagrama (a^*b^*)

Análogamente, la Figura 37 muestra el diagrama de color (a^*b^*) de las muestras en la etapa de fermentación maloláctica. En ella se aprecia también los ensayos con distintas cantidades de semillas agrupados en una posición entre 0 y -5 de ángulo de tono, aunque los colores tienden hacia el centro del diagrama, con menores valores de croma. Es decir, en esta etapa se ha producido un viraje del color de los vinos hacia rojos más netos y menos vivos. Los puntos aparecen algo más dispersos, aunque no están delimitados los correspondientes a cada

grupo, por lo que sigue sin apreciarse diferencias relevantes entre los distintos ensayos.

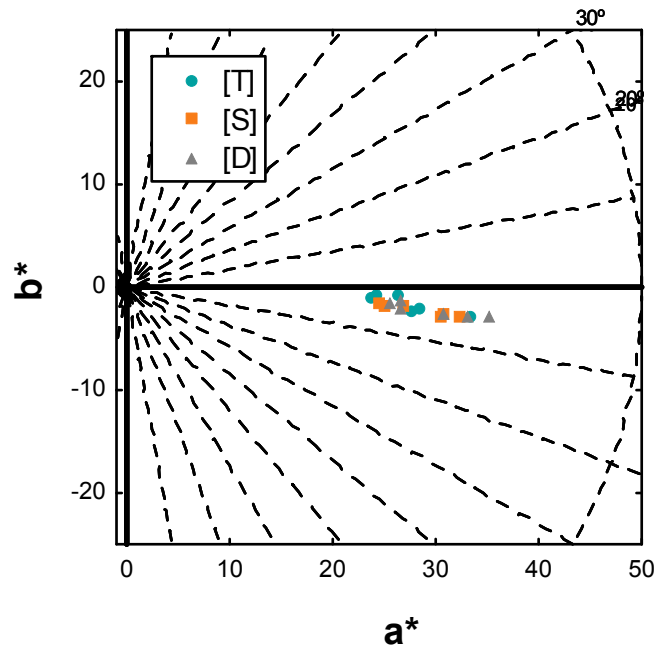


Figura 37: Localización de las muestras en la etapa de Fermentación Maloláctica (FML) en el diagrama (a^*b^*).

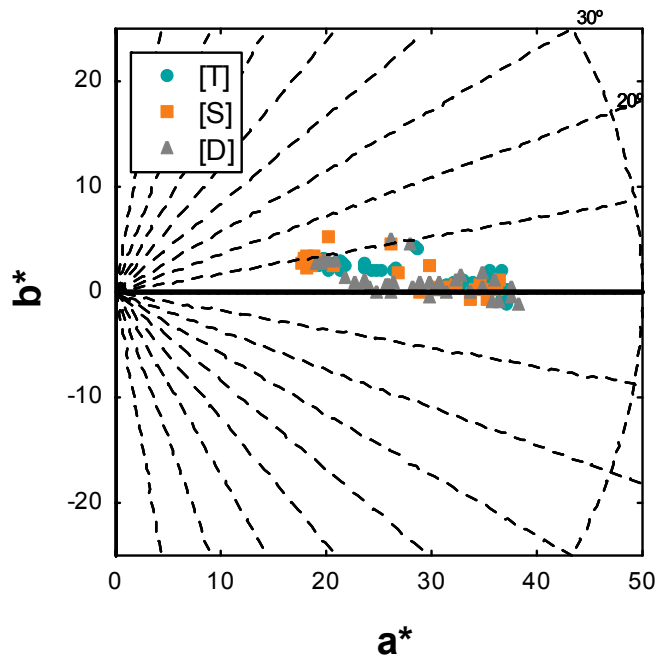


Figura 38: Localización de las muestras en la etapa de Estabilización (EST) en el diagrama (a^*b^*).

En el diagrama (a^*b^*) que aparece en la Figura 38 se muestra una diferencia de color apreciable en la etapa de estabilización con respecto a las anteriores. La mayoría de las muestras están ahora ubicadas en valores de tono entre 0° y 10° , siendo éstos colores rojos ya sin los matices azulados. También se observa un ligero desplazamiento hacia el origen de coordenadas de los ensayos de adición simple de semillas (menos croma); sin embargo, las muestras del testigo y de adición doble de semillas permanecen en zonas más alejadas del origen, correspondientes a colores más vivos (mayor croma).

4.4. Tratamiento estadístico de los resultados.

Con el fin de determinar si las diferencias observadas entre los vinos tienen significación estadística, se realizó un **análisis de la varianza (ANOVA)** a los datos obtenidos. De acuerdo con el objetivo principal de este estudio, las diferencias de interés son aquéllas ejercidas por el efecto de la distinta elaboración (adición de semillas) en los vinos finales. Por esta razón, para el análisis estadístico se seleccionaron las muestras de los vinos cuando éstos se encontraban en fase de estabilización. En la Tabla 15 se recogen los valores de probabilidad (p-valor) para cada uno de los ANOVA que mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$), considerando las variables de manera independiente.

Así, entre los parámetros colorimétricos (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} y h_{ab}), se encontraron diferencias significativas entre los ensayos con adición de semillas [S] y [D], con respecto a la coordenada b^* y al tono h_{ab} .

Para los antocianos monoglucósidos, tanto en el caso de Delfinina como en Petunidina se encontraron diferencias significativas entre [D] y los otros dos ensayos [T] y [S], mientras que en Malvidina solo entre [S] y [D].

Los antocianos acetilados no mostraron diferencias significativas entre los ensayos. Sin embargo, sí hubo diferencias significativas respecto a los cumarilados: entre [S] y [D] para Petunidin 3-cumarilglucosido, entre [T] y [S] para Peonidin 3-cumarilglucosido, y en ambos casos para Malvidín 3-cumarilglucosido.

Cuando se consideran los valores totales de estos compuestos también se han encontrado diferencias significativas: entre [S] y [D] para Antocianos Totales, Fenoles Totales, Monoglucósidos Totales y derivados cumarílicos Totales, y en este último caso, también para [T] y [S].

En el caso de Pigmentos Poliméricos se encontraron diferencias significativas entre [T] y [S].

Tabla 15: Resultados del análisis de la varianza (ANOVA) para los vinos finales

Parámetro	Vinos	p-valor
b*	[S] / [D]	0.018871
hab	[S] / [D]	0.002210
Delfinidina 3-glucósido	[T] / [D]	0.000105
	[S] / [D]	0.000515
Petunidina 3-glucósido	[T] / [D]	0.001626
	[S] / [D]	0.000715
Malvidina 3-glucósido	[S] / [D]	0.015735
Petunidin 3-cumarilglucosido	[S] / [D]	0.043130
Peonidin 3-cumarilglucosido	[T] / [S]	0.005582
Malvidín 3-cumarilglucosido	[T] / [S]	0.006118
	[S] / [D]	0.013205
Derivados monoglucósidos Totales	[S] / [D]	0.007901
Derivados cumarílicos Totales	[T] / [S]	0.005362
	[S] / [D]	0.013056
Antocianos Totales	[S] / [D]	0.022282
Fenoles Totales	[S] / [D]	0.041623
Pigmentos Poliméricos	[T] / [S]	0.003188

En resumen, se observa que las diferencias significativas se dan, en la mayoría de los casos (58%), entre los vinos de los ensayos [S] (adición simple de semillas) y [D] (doble adición de semillas). Además, el vino del ensayo simple está implicado en el 89% de las diferencias significativas, y en los dos únicos casos en los que se encontraron diferencias significativas entre en ensayo doble [D] y el testigo [T], también la hubo entre [D] y [S].

De estos resultados se puede extraer que la adición de semillas parece ejercer un efecto diferenciador de los vinos, pero cuando ésta se realiza en una cantidad no muy elevada.

Con el fin de identificar las características que permiten diferenciar los vinos, y poder clasificar las muestras como pertenecientes a uno u otro grupo, se ha aplicado el **análisis discriminante por etapas** o **SDA** (*Stepwise Discriminant Analysis*) a los vinos finales (en la etapa de estabilización), en relación a los datos de color.

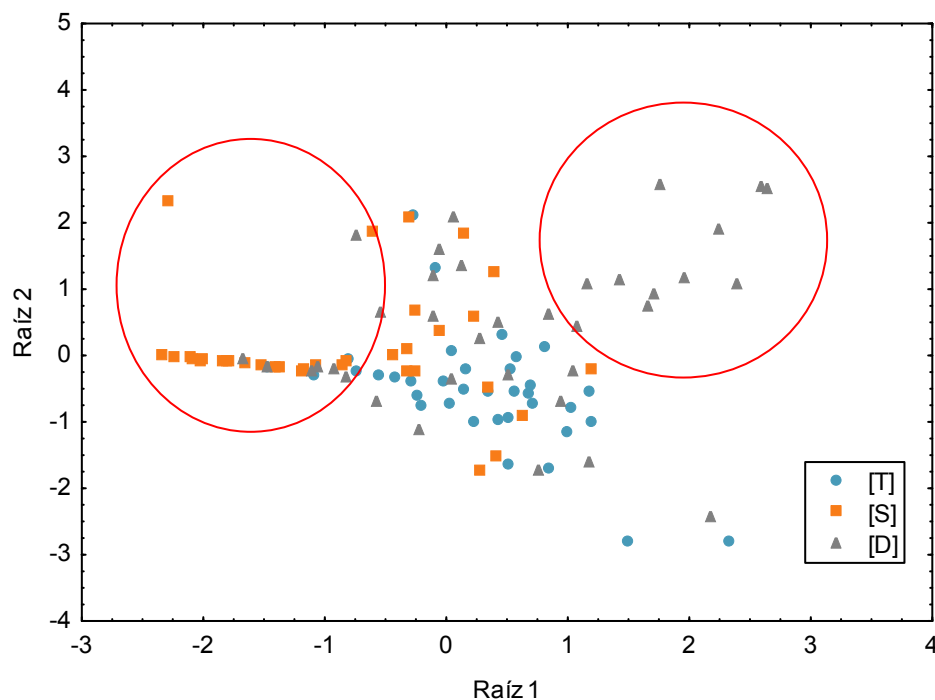


Figura 39: Gráfico de dispersión del Análisis Discriminante

Así, al incluir en el estudio los parámetros colorimétricos L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} y h_{ab} , como variables independientes, frente a la variable “Ensayo” como variable de grupo, se obtienen porcentajes medios de correcta clasificación (66,7% para [T], 62.86% para [S] y 52.7% para [D]) con un porcentaje global de clasificación correcta del 60.8%.

La Figura 39 representa el gráfico de dispersión de las puntuaciones canónicas para este análisis discriminante, donde puede observarse de manera gráfica lo obtenido en la clasificación. Es decir, los ensayos testigo y de adición simple muestran un mayor grado de diferencia entre ellos, mientras que el ensayo de adición doble tiene características colorimétricas intermedias entre ambos grupos, lo que dificulta la correcta clasificación de los grupos respecto al color, pero demuestra que la adición de semillas en cantidad elevada produce efectos contradictorios que deberán ser estudiados en ensayos posteriores.

5. CONCLUSIONES.

Se ha realizado un estudio de aprovechamiento de semillas, como subproducto de vinificación, para la mejora de la calidad y estabilidad del color de vinos tintos elaborados en clima cálido. De los resultados obtenidos cabe destacar las siguientes conclusiones:

Primera: La adición de semillas de la variedad Pedro Ximénez, procedentes de paseras para la vinificación de generosos, en la elaboración de vinos tintos de variedad Syrah produce efectos en las características químicas y cromáticas del vino, cuando se realiza en cantidades medias (3 g/L), encontrándose diferencias significativas respecto, tanto al vino testigo (0 g/L), como al adicionado con cantidades más elevadas (6 g/L), en el 89% de los casos en los que se dieron estas diferencias.

Segunda: Químicamente, el efecto diferenciador se manifiesta en la composición fenólica de los vinos con un incremento en las concentraciones totales de fenoles, flavonoles y antocianos, así como en los antocianos individuales, monoglucósidos y derivados acetilados y cumarilados. En los tres ensayos, la Malvidina (3-glucósido y sus derivados acetilado y cumarilado) fue el antociano de mayor concentración.

Tercera: No se encuentra una relación directa entre la cantidad de semillas añadidas y el efecto producido. Por el contrario, los resultados obtenidos para el ensayo de adición doble (6 g/L) son, en la mayoría de los casos, más cercanos al vino control (0 g/L) que al ensayo de adición simple (3 g/L). Esto parece indicar que podría existir una cantidad crítica de compuestos fenólicos en el vino que, una vez superada, tiene efectos adversos, probablemente por reacciones de polimerización y/o precipitación.

Cuarta: En el estudio del efecto sobre la copigmentación, se encontraron valores ligeramente superiores de antocianos copigmentados en el ensayo de adición simple de semillas, aunque no se dieron diferencias significativas entre los ensayos.

Quinta: Los valores más bajos de pigmentos poliméricos se dieron en el ensayo simple, mostraron diferencias significativas con el testigo, lo que está en consonancia con la mayor prevalencia de los fenómenos de copigmentación cuando se añaden las semillas.

Sexta: En cuanto al color, el efecto de la adición de semillas induce diferencias en los tres parámetros psicofísicos: claridad, croma y tono. Los vinos con adición simple presentan mayor claridad y menor croma a lo largo de la vinificación, especialmente durante la fermentación maloláctica y las primeras etapas de la estabilización. En el caso del tono, con diferencias significativas en la estabilización, aunque no son muy marcadas, se manifiestan en una ligera tendencia a matices rojo-azulados, en algunos casos de los vinos finales del ensayo de adición de cantidad media de semillas.

Séptima: A lo largo de la vinificación, las muestras con adición simple de semillas pasan por tonos más anaranjados, especialmente en etapas como las fermentaciones alcohólica y maloláctica. Sin embargo, son las que presentan valores medios del tono más bajos, y por tanto con rojos más netos que en los ensayos testigo y doble, lo que indica una más adecuada evolución del color.

6. BIBLIOGRAFÍA.

Amerine, M. A., Ough, C. S. *Análisis de vinos y mostos*. 1976 Ed. Acribia, España

Boulton, R. B. *Methods for the assessment of copigmentation in red wines*. Presented at the 47th Annual Meeting of the American Society for Enology and Viticulture, Reno, NV. June 1996.

Brouillard, R. *Chemical structure of anthocyanins* en "*Anthocyanins as food color*". 1982, Ed. P. Markakis, Academic Press, New York, pp. 1-40.

Cuinier, C. *Ceppi di lievito e composizine fenolica dei vini rossi*. Viegnevini, 1997, 7/8, 39-42.

CEE. *Métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino*. Reglamento No. 2676/90. 1990.

Darias-Martín, J., Carrillo-López, M., Echavarri-Granado, J. F., Díaz-Romero, C. *The magnitude of copigmentation in the colour of aged red wines made in the Canary Islands*. European Food Research and Technology. Vol. 224, Pag. 643-648. 2007.

García, J., Xirau, M., Azorín, R. *Técnicas usuales de análisis en Enología*, 2005. Panreac Química S. A, Barcelona.

Gil, A. *Tratado de Nutrición. Tomo II: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos*. 2ª Ed. Editorial Medica Panamericana, 2010.

González-San José, M. L. *Transferencia de color de la uva al vino*. ACE Revista de Enología, 2005, 61.

Hebrero, E., García-Rodríguez, C., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J. C. *Analysis of anthocyanins by high performance liquid chromatography-diode array spectrometry in a hybrid grape variety (Vitis vinífera x Vitis berlandieri 41B)*. Am. J. Enol. Vitic. 1989, 40, 283-291.

Hermosín Gutiérrez, I.; González (2003). Influence of ethanol content on the extend of copigmentation in a Cencibel young red wine. *J. Agric. Food Chem*, 51, 4079-4083.

Heredia, F. J., Francia-Aricha, E., Rivas-Gonzalo, J. C., Vicario, I. M., Santos-Buelga, C. *Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes*. I-pH effect. *Food Chem*. 1998, 63 (4), 491-498.

Hidalgo Togores, J. *Tratado de enología*, 2011. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.

King, G. A., Swenny, J. C., Radford, T. Iacobucci, G. A. *The ascorbic degradation of anthocianidins*. *Bull. Liason Gp. Polyphenols*. 1980, 9, 121-128.

Liao, H., Y. Cai Y E. Haslam, (1992). "Polyphenol interactions. Anthocyanins: Copigmentation and colour changes in red wines", *J. Sci. Food. Agric.*, 1992; 59: 299-305.

Kountoudakis, N., Canals, R., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J. M., Zamora, F., *Maceración prefermentativa en frío. Aspectos tecnológicos en la elaboración de vinos de crianza*. Grupo de Investigación en Tecnología Enológica (TECNENOL), Departamento de Bioquímica y Biotecnología. Facultad de Enología de Tarragona. Universidad Rovira i Virgili, 2009.

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2016.

Puértolas. E., Álvarez. I., Raso. J., *Changes in phenolic compounds of Aragón red wines during alcoholic fermentation*. *Food Science and Technology International*. 2011. 17. 77-86

Revilla, E., García-Beneytez, E., Cabello, F., Martín-Ortega. G., Ryan, J. M. *Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them*. *Jchrom. A*. 2001, 915, 53-60.

Riberéau-Gayón, P. *Anthocyanins of grapes and wines*. Anthocyanins Food Colors (Markakis, P., eds.), 1982, Academic: New York, 209-244.

Riberéau-Gayón, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, Y. 1999. *Phenolic Compounds in Handbook of enology*, Vol 2, The Chemistry of wine, Stabilization and treatments. Ed. John Wiley y son, Ltd, Chichester, 129-189.

Rivas-Gonzalo, J., C. Santos Buelga Y O. Lock, (2003). Química y Estabilidad. pp.26-59. In: Muñoz, O (Ed). *Antocianos y Betalainas, colorantes naturales de aplicación industrial CYTED*. Editorial Salesianos, Santiago, Chile

Rivas-Gonzalo, J.C.; Bravo-Harp, S.; Santos-Buelga, C. (1995). *Detection of compounds formed through the reaction of malvidin 3-monoglucoside and catechin in the presence of acetaldehyde*. J. Agric. Food Chem., 43, 1444-1449.

Santos-Buelga, C., Bravo-Haro, S. Rivas-Gonzalo, J. C. *Interactions between catechin and malvidine-3-monoglucoside in model solutions*. 2001. Z Lebensm. Unters.

SEPSA. *Metodología de análisis de vinos y alcoholes*. Sociedad Expendedora del Panadés, S.A., 1969

Vasserot, Y., Caillet, S., Maujean, A. *Study of anthocyanin adsorption by yeast lees. Effect of some physicochemical parameters*. Am J Enol Vitic. 1997, 48 (4), 433-437.

Yokotsuka, K., Nagao, A., Nakazawa, K., Sato, M., *Changes in anthocyanins in berry skins of Merlot and Cabernet Sauvignon grapes grown in two soils modified with limestone or oyster shell versus a native soil over two years*. 1999. Am J Enol Vitic., 50, 1-2.

Vivar-Quintana, A. M., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J. C., *Anthocyanin-derived pigments and color of red wines*. An Chim Acta. 2002, 458, 523-527.

Vogt J. *El vino: obtención, elaboración y análisis* (1986) Ed. Acribia

Zamora, F. *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*, 2003- AMV Ediciones y Ed. Mundiprensa, Madrid, España.